



**Maria da Conceição
Vaz Angélico**

**Desenvolvimento de um Sensor para a Especificação
do Enxofre em Amostras Ambientais**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Prof. Doutor João Evangelista de Jesus Simão, Professor Jubilado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do programa PRODEP
ao abrigo do eixo 3, medida 5, acção
5.3 – Formação Avançada de
Docentes.

*Ao José Guilherme e ao Diogo pela construção de um
sólido projecto de vida !!*

*À memória do meu Pai para quem a vida era um pulo
numa estrela !!*

“Não se quer um químico que tenha aprendido esta ciência lendo apenas livros, mas um que a tenha compreendido exercitando-se com dedicação nesta arte”.

M. Lomonóssov

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Helena Nazaré
Reitora da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João Evangelista de Jesus Simão
Prof. Catedrático Jubilado do Dep. de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
Prof. Associado do Dep. de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Prof. Associado do Dep. De Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Filomena Maria da Rocha Meneses de Oliveira Soares
Prof. Associada da Escola de Eng^a da Universidade do Minho

Professor Doutor João Alberto Sobrinho Teixeira
Presidente do Instituto Politécnico de Bragança

agradecimentos

O desenvolvimento de um projecto de investigação obriga a percorrer um caminho duro e solitário que só o auxílio de um conselho sábio, de uma mão segura e de uma presença amiga o ameniza e permitem que o trabalho seja levado a bom termo. Esta foi a luz que me alumiou.!

Assim, expresso a minha gratidão ao Senhor Professor João Simão, o mestre, pela sua discreta, sábia e constante orientação, impulsionador de todos os trabalhos que desenvolvi, por me ter incentivado a encetar mais este projecto e por não ter permitido que dele desistisse. Perdoe pelo que não correspondei.

Também ao Sr. Doutor João Oliveira agradeço o ter gizado e orientado o trabalho e cuidasse para que nada me faltasse no laboratório.

Para a Sra. Doutora Teresa Gomes um muito obrigada pela dedicação que dispensou e pelas preciosas sugestões.

À Universidade de Aveiro agradeço a aceitação da intenção de executar este projecto.

O meu reconhecimento à Escola Superior Agrária de Bragança pelas facilidades concedidas para me poder dedicar a este trabalho.

Pela prontidão com que sempre me fizeram o que foi necessário, agradeço às Sras. D. Olinda e Maria do Céu do Laboratório de Química, bem como aos Srs. Engs Sandra Barbosa e Valentim, meus dedicados ex-alunos, por me terem ensinado os rudimentos da microbiologia.

Ao Laboratório de Microbiologia agradeço o isolamento das espécies dos microorganismos com que me deparei. Ao Laboratório de Fitotecnia e à Doutora Eugénia Gouveia agradeço a disponibilidade do material de que necessitei e as palavras de conforto de quem caminha pelos mesmos trilhos.

Pela encadernação, muito obrigada ao Dr. Atilano e à Sra. D. Isaura.

Ao Eng. David Cabral, obrigada por tanto “sim”.

Conhecida de muitas primaveras e reencontrada em Aveiro, para a Dra. Teresa Caldeira, a minha gratidão por me ter integrado no departamento, pela ajuda nos vários trabalhos dentro e fora do laboratório.

Para quem me levava a ver as luzes da cidade, quando se apagavam as luzes da alma e da esperança, a minha colega Alzira, companheira das mesmas lutas e das mesmas técnicas, o meu profundo reconhecimento.

À Mariete, colega de projecto, agradeço as lamentações diárias. Lamentando juntas encontrámos maior lenitivo.

Às minhas Lurdes e Paulina, por ter declinado tanto convite, prometo idas ao Tavares, à Golegã, a S. Tomé e retomar a tagarelice que enfeita as nossas lides domésticas. À minha irmã, agradeço pelo que me acompanhou.

Este projecto nunca teria sido realizado sem a ajuda de muitos. Para os que não mencionei, o meu reconhecimento.

Por fim, peço perdão ao meu Pai pela companhia que não lhe fiz.

palavras-chave

Cristais piezoelétricos, sensores, especiação, fungo *Sporothrix*, metionina, microbalança de cristais piezoelétricos de quartzo.

resumo

A diversidade de águas sulfúreas, bem como a existência do enxofre em amostras ambientais, levou-nos a que se tentasse desenvolver um método capaz de fazer a especiação deste elemento.

Havendo já vários métodos rotinizados para a especiação do enxofre inorgânico e apenas um para o orgânico, este trabalho visou desenvolver um sensor que determinasse o enxofre orgânico a fim de poder quantificar todas as formas de enxofre existentes numa determinada amostra.

Este sensor, baseado nos cristais piezoelétricos de quartzo, utiliza um microorganismo, o fungo *Sporothrix*, que se alimenta de enxofre orgânico e que vive nas fontes de águas sulfúreas.

Assim, a primeira parte deste trabalho consistiu na recolha do fungo *Sporothrix*, no estudo das suas características e da sua cultura em laboratório de modo a que pudesse vir a integrar o sensor.

Na segunda parte do trabalho ensaiaram-se as diversas formas de imobilização do fungo sobre o cristal a fim de construir o sensor adequado.

Fez-se ainda o estudo do consumo da L-metionina pelo fungo, que resultou positivo. O fungo *Sporothrix* consumiu, ao fim de alguns dias, toda a metionina que se lhe forneceu. A L-metionina é um aminoácido, que, de acordo com a literatura, constituía uma das espécies com enxofre à qual o fungo respondia mais facilmente e que pôde ser a solução de ensaio neste trabalho.

Seguiu-se o ensaio das metodologias que permitiriam a determinação do enxofre orgânico. A maior parte delas resultou infrutífera.

O método da cultura líquida, que consistiu em colocar o sensor em contacto com o fungo, mostrou resultar, tendo-se obtido, com este método uma curva de calibração que virá a ser aperfeiçoada.

Finalmente e com a cultura líquida pôde ainda ser reconhecida a metionina em todos os ensaios em que estava presente o fungo *Sporithrix*.

keywords

Piezoelectric quartz crystals, sensor, speciation, the *Sporothrix* fungus, L-methionine, piezoelectric quartz crystal microbalance

abstract

The presence of sulfur in environmental samples namely its occurrence of sulfur-rich waters prompted for the development of a new method, to perform the speciation of this element.

Although there were several routinely used methods for the speciation of inorganic sulfur, for the organic there was only one. The aim of this work was to develop a sensor for the quantification of organic sulfur in water samples.

This sensor, based on a combination of a microbalance based on piezoelectric quartz crystals and a microorganism, the *Sporothrix* fungus, would combined the very low detection capabilities of the microbalance with the very high specificity of the microorganism.

The first part of this work deals with the confirmation of this specific fungus in sulfur-rich waters, the study of its characteristics and of its culture in order to use it as a sensor. For the second part several options were studied for the combination of microbalance/fungus to be used as a sensor.

The consumption of organic sulfur by the fungus was confirmed using different liquid cultures with different concentrations of L-methionine. This was elected as the workhorse compound throughout this study because according to the literature, once the fungus is exposed to it, a vigorous growth occurs.

Several methodologies using the immobilized fungus on the piezoelectric quartz crystal were used, but none of them gave positive results. Finally, the so called "method of the liquid culture", in which the fungus was not on the crystal but rather in solution, seemed to give promising results based on the fact that a calibration line of the time of the fungus to consume L-methionine versus the concentration was obtained.

In order to be sure that this combination of the fungus and the piezoelectric quartz crystal was functioning as a sensor for organic sulfur, experiments were made where L-methionine was added to water in which the fungus could be present or not. It was observed that in the solutions without the fungus the crystal responded to the variations of the characteristics of the solution, namely density and viscosity; in the solutions with the fungus, after a while the sensor got back to its original value, showing that the fungus had consumed the L-methionine.

The conjunction of both facts, the above mentioned calibration line and the response to the change of the characteristics of an L-methionine solution, showed that the proposed device can be used as a sensor for organic sulfur.

Índice

1 Introdução.....1**2 Microbalança de Cristais Piezoelétricos**

2.1 Piezoelectricidade.....	3
2.2 Os Cristais Piezoelétricos de Quartzo (CPQ).....	4
2.3 Aplicação dos Cristais Piezoelétricos à Detecção de Analitos em Fase Gasosa	7
2.4 Aplicação dos Cristais Piezoelétricos à Detecção de Analitos em Fase Líquida	9
2.5 Referências Bibliográficas.....	12

3 O Fungo e o Enxofre Orgânico

3.1 Os Fungos.....	14
3.1.1 Introdução.....	14
3.1.2 Estrutura das Células.....	15
3.1.3 Reprodução.....	17
3.1.4 Nutrição.....	18
3.1.5 Crescimento.....	19
3.1.6 Medida do Crescimento do Fungo numa cultura	19
3.1.7 Crescimento de um Fungo numa Cultura	20
3.1.8 Exigências Nutricionais para o Crescimento	20
3.1.9 Captação.....	21
3.1.10 Elementos Essenciais	22
3.1.11 O Metabolismo	23
3.2 O Fungo Sporothrix e o Enxofre.....	24
3.2.1 O Fungo Sporothrix.....	24
3.2.2 O Fungo Sporothrix e o Enxofre	24
3.3 Referências Bibliográficas.....	28

4 Biossensores

4.1 Os Biossensores e as suas Características	30
4.2 Estado da Arte	31
4.3 Utilização de Cristais Piezoelétricos como Biossensores	32
4.4 Imobilização de Biomateriais	33

4.5 Imobilização do Sporothrix.....	34
4.6 O Alginato de Sódio.....	34
4.6.1 A Estrutura Molecular e as Propriedades do Alginato de Sódio	36
4.6.2 A Produção do Alginato de Sódio	39
4.7 Referências Bibliográficas.....	41

5 Equipamento e Procedimento Experimental

5.1 Considerações Gerais.	44
5.2 Lavagem do Material	44
5.3 Reagentes	44
5.4 Equipamentos e Montagens Utilizadas nos Ensaios	45
5.5 Procedimento Experimental	48
5.5.1 Deposições dos Fungos nos Cristais	48
5.5.2 Cultura do Fungo Sporothrix	48
5.5.3 Comparação do Fungo Sporothrix com o Existente nas Águas Sulfúreas do Distrito de Bragança	49
5.5.4 Determinação da Metionina por Espectrofotometria de UV/Vis	49
5.5.5 Comportamento do Fungo com a L-Metionina	50
5.5.6 Imobilização do Fungo Sporothrix sobre o Cristal Piezoeléctrico	50
5.5.7 Determinação da Metionina Utilizando Uma MCQP e o Fungo Sporothrix ...	51
5.5.8 Resposta do Sensor ao Enxofre Orgânico	52

6 Resultados e Discussão

6.1 A Cultura do Fungo.....	54
6.1.1 Comparação do Fungo Sporothrix com o Existente nas Águas Sulfúreas do Distrito de Bragança	56
6.2 Evidência Experimental da Metabolização do Enxofre pelo Fungo	60
6.3 Imobilização da Mistura do Micélio e do Fungo com Alginato de Sódio, Polimerizado com Cloreto de Cálcio, sobre o Eléctrodo	63
6.4 Imobilização da Cultura do Fungo Directamente sobre o Eléctrodo	68
6.4.1 Método das Adições Separadas.....	72
6.4.2 Método das Adições Sucessivas	73
6.5 Determinação da L-metionina Utilizando uma MCPQ.....	76
6.5.1 Meio com Fungo e Meio sem Fungo	76
6.5.2 Variação da Frequência com a Concentração de L-metionina	78

6.6 Resposta do Cristal piezoelétrico à adição de L-metionina.....	85
6.6.1 Resposta do Cristal piezoelétrico numa solução com fungo, à adição da L-metionina.....	86
6.6.2 Resposta do Cristal piezoelétrico numa solução com fungo, à adição da L-metionina.....	88

7 Conclusão Geral

7 Conclusão Geral.....	93
------------------------	----

Índice de figuras

Figura 1 Célula elementar piezoelectrica (perovesquite), (a) antes de polarizar, (b) depois de polarizar	3
Figura 2 Nodo dos planos de um cristal de quartzo com a deformação provocada pelo cisalhamento	4
Figura 3 (a) representação de um cristal de quartzo com os respectivos eixos, (b) orientação do corte AT, (c) orientação do corte BT	5
Figura 4 Aspecto de um cristal de quartzo piezoeléctrico com os eléctrodos em ambas as faces	6
Figura 5 Esquema do desenvolvimento de um fungo	14
Figura 6 Aspectos das hifas. Em (a) vê-se que podem ser multinucleares e em (b) a sua forma alongada. Ampliação 400x	15
Figura 7 Estruturas da celulose, da glucose e da quitina.....	16
Figura 8 Esquema da alimentação de um fungo por fraccionamento dos polímeros.	21
Figura 9 O microfungo na forma de Clamidosporos (a) e na forma de blastoconideas	26
Figura 10 Esquema simplificado de um biossensor	31
Figura 11 Representação da estrutura do alginato	34
Figura 12 Representação das estruturas dos ácidos D-galacturónico, D-manurónico e Lgulurónico	35
Figura 13 Estrutura dos alginatos.....	36
Figura 14 Estrutura de um alginato de cálcio vista de cima e de lado, respectivamente, onde as esferas maiores e mais escuras representam os átomos de cálcio	37

Figura 15 Célula de teflon onde encaixa o copo de aproximadamente 20 mL e o cristal de quartzo piezoeléctrico	45
Figura 16 Imagem da montagem de uma célula termostatzada, ligada a um banho termostatzado	46
Figura 17 Montagem das células dentro de uma estufa, ligadas aos respectivos osciladores, frequencímetros e computador em que se podia fazer a adição de solução a ser estudada pela introdução de uma micropipeta	47
Figura 18 Aspecto da cultura pura do fungo adquirido (a) e aspecto da mesma cultura num meio que lhe não é favorável (b).	54
Figura 19 Aspecto de uma preparação de uma cultura pura do fungo adquirido (a). Outro aspecto da mesma preparação (b). Ampliação 400x.....	55
Figura 20 Da mesma preparação outro aspecto da cultura pura do fungo adquirido com grande concentração de esporos (a) e aspecto da mesma cultura pura com esporos em navete (b). Ampliação 400x	56
Figura 21 Cultura resultante da colheita dos limos das termas de S. Lourenço, de onde se isolaram diversos microorganismos.....	57
Figura 22 Dois aspectos diferentes da mesma preparação feita da placa que tinha a cultura pura do fungo <i>Sporothrix</i> . Em (a) vêem-se as hifas contendo os esporos e em (b) são mais visíveis os esporos. Ampliação 400x.....	58
Figura 23 Da mesma preparação, a anterior, dois aspectos da cultura do fungo <i>Sporothrix</i> isolado da cultura dos limos com grandes hifas muito visíveis (a) e aspecto da mesma cultura com hifas noutra posição (b). Ampliação 400x.....	58
Figura 24 Esta figura mostra a existência de penicilina numa preparação feita da cultura isolada da cultura dos limos. Maior concentração de penicilina (a) e menos concentração de penicilina (b). Ampliação 400x.....	59
Figura 25 Imagem de duas preparações referentes a duas culturas que se isolaram da cultura feita com os limos. Bactérias (a) e leveduras (b). Ampliação 400x	60

Figura 26 Imagem da preparação da cultura do fungo depois de ter crescido na L-Metionina.	62
Figura 27 Exemplo da solução depois de o fungo ter metabolizado toda a L-metionina existente	88

Índice de Gráficos e de Tabelas

Gráfico 1 Calibração de uma das determinações da L-metionina que restava da cultura do fungo <i>Sporothrix</i> em meio líquido	61
Gráfico 2 Variação da concentração da L-metionina da cultura líquida ao longo do tempo	61
Gráfico 3 Variação da frequência com a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina 10 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C.....	63
Gráfico 4 Variação da frequência com a a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução de 10 mg S/L de L-metionina e numa célula termostatzada a 28°C	64
Gráfico 5 Variação da frequência com a deposição da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 10 mg S/L de L-metionina e com a célula na estufa a 28°C.....	65
Gráfico 6 Variação da frequência com a deposição da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 10 mg S/L de L-metionina e com célula termostatzada a 28°C.....	66
Gráfico 7 Variação da frequência da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 100 mg S/L de L-metionina e com a célula na estufa a 28°C	67
Gráfico 8 Variação da frequência com a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 100 mg S/L de L-metionina e com a célula termostatzada a 28°C.....	67
Gráfico 9 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina com 10 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C	68

Gráfico 10 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina com 20 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C.	69
Gráfico 11 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 40 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C	69
Gráfico 12 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina a 60 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C.	70
Gráfico 13 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 0,25 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C.	71
Gráfico 14 Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 0,5 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C.	71
Gráfico 15 Exemplo dos gráficos obtidos com o método das adições separadas. As concentrações utilizadas foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L de L-metionina.	72
Gráfico 16 Resultado de adições sucessivas. Em cada adição foram injectadas alíquotas de 0,4 mL de metionina de concentração de 20 µg/mL.....	73
Gráfico 17 Adições sucessivas de alíquotas de 0,2 mL de metionina com 20µg/mL, depois de ter conseguido estabilizar o sistema.	74
Gráfico 18 Nesta experiência as adições foram de 4x2µL (4x20µg/Sml), de 4x10µL (4x10µgS/ml) e de 3x30µL (3x30µgS/ml) de L-metionina e de 3x30µl de água.....	75
Gráfico 19 Variação da frequência com o tempo, de uma cultura líquida de 10,24 mg S/L em que há fungo no líquido.	77

Gráfico 20 Variação da frequência com o tempo numa solução de 10,24 mg S/L de L-metionina e sem fungo.	78
Gráfico 21 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 0,50mg S/L.	79
Gráfico 22 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 0,75 mg S/L.	80
Gráfico 23 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 1 mg S/L.	81
Gráfico 24 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 1,50 mg S/L.	82
Gráfico 25 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 2,00 mg S/L.	82
Gráfico 26 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 5,00 mg S/L.	84
Gráfico 27 Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 6,00 mg S/L.	84
Gráfico 28 Recta de calibração resultante dos tempos em que o fungo demorou a atingir um patamar com cada uma das concentrações de L-metionina do meio em que se encontrava.	85
Gráfico 29 Adição de 2x60µL ou de 2x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.	86
Gráfico 30 Adição de 3x60µL ou de 3x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.	87

Gráfico 31 Adição de 2x60µL ou de 2x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.	87
Gráfico 32 Adição de 1x60µL ou de 1x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.	89
Gráfico 33 Adição de 1x60µL ou de 1x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.	89
Gráfico 34 Adição de 1x60µL ou de 1x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.	90
Tabela 1 Comparação das respostas do cristal piezoelétrico à adição de L-metionina, com fungo e sem fungo.	91

Lista de Símbolos:

A : área piezoelectricamente activa (cm^2)

C : Constante de sensibilidade de massa

CPQ: Cristal Piezoelectrico de Quartzo

f_0 : Frequência de Ressonância Fundamental

GC : Cromatografia Gasosa

K: Constante de Proporcionalidade

MCPQ: Microbalança de Cristais Piezoelectricos de Quartzo

PDA: Potato Dextrose Agar

T : Temperatura

UV : Ultra-violeta

Δm : Variação de massa (g)

ΔF : Variação da Frequência (Hz)

μ_q : Modulo do Corte do Quartzo

ρ_q : Densidade do Quartzo

ρ : Densidade do Líquido

η : Viscosidade do Líquido

π : Representa a Constante 3,1416

1 - Introdução

A existência de fontes sulfúreas no Nordeste Transmontano levou a que se tentasse, através dos vários métodos analíticos disponíveis, classificar cada uma delas segundo as formas de enxofre que nelas se encontrasse.

Como existem várias formas de enxofre passíveis de serem analisadas, começou por se estudar quais os métodos analíticos mais expeditos e quais os que abrangiam todas as formas de enxofre.

Pelo estudo das análises de rotina chegou-se à conclusão de que os métodos utilizados eram o método iodométrico e o método potenciométrico. Mas estes métodos não incluíam o estudo do enxofre orgânico. Através das diligências feitas junto dos vários laboratórios concluiu-se que nenhum deles fazia a análise ao enxofre orgânico.

Com este trabalho pretendia-se medir o enxofre na forma orgânica, o enxofre na forma inorgânica com os métodos disponíveis e em seguida a determinação do enxofre total. Uma vez que havia métodos capazes de determinar o enxofre inorgânico, pretendia-se desenvolver um método que nos conduzisse à determinação do enxofre orgânico.

Tem-se verificado que nas últimas décadas as ciências analíticas têm experimentado um grande avanço, relativamente à capacidade de obter informações químicas de modo a conduzir a uma automação e simplificação dos sistemas. Assim, optou-se por saltar as fronteiras das análises ditas clássicas e experimentar trabalhar com os sensores químicos sendo o objectivo deste trabalho o desenvolvimento de sensores químicos para a especificação do enxofre em amostras ambientais. Os sensores químicos baseados nos cristais piezoeléctricos de quartzo (CPQ) são dispositivos que transformam uma informação química num sinal analítico útil. Estes sensores podem-nos dar informações das concentrações das espécies com as quais estão em contacto. Sendo baseados nos cristais piezoeléctricos de quartzo têm a vantagem de aliar a uma elevada sensibilidade os baixos custos de instrumentação.

Com este trabalho e como já se disse pretendeu-se desenvolver um sensor para a especificação do enxofre baseado nos cristais piezoeléctricos de quartzo e ainda numa espécie biológica que fosse sensível ao enxofre orgânico. Assim, durante todo o trabalho utilizou-

se o fungo *Sporothrix* que se alimenta de enxofre orgânico e vive nas fontes de água sulfúrea como se verá adiante.

Consequentemente, a primeira parte deste trabalho consistiu no estudo do fungo *Sporothrix*, suas características e na sua cultura nos vários meios.

Seguiram-se as tentativas de imobilizá-lo sobre o cristal, depois do que se passou aos testes da metodologia que nos levasse à determinação ou quantificação do enxofre nas soluções que se encontravam em contacto com o sensor.

O objectivo definitivo para este trabalho era o estudo das águas sulfúreas do Nordeste Transmontano. Para isso, havia que introduzir, no laboratório, os métodos correntes de análise dos compostos de enxofre. Seguidamente e para desenvolver o sensor para a especiação do enxofre em amostras ambientais, havia que fazer pesquisa bibliográfica. Através desta pesquisa, soube-se da existência de um microorganismo que utiliza compostos orgânicos de enxofre na sua alimentação (Lepidi et al., 1973 Bertoldi et al., 1972).

Estava-se perante dois desafios, o do estudo do microorganismo e o de poder quantificar o enxofre orgânico através do seu metabolismo, para além do objectivo primeiro deste trabalho.

2 – Microbalança de Cristais Piezoelétricos

2.1 – Piezoelectricidade

Uma vez que este trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de um sensor para a especiação do enxofre em amostras ambientais e sendo este sensor baseado num cristal piezoelétrico de quartzo, houve necessidade de estudar a piezoelectricidade bem como os cristais piezoelétricos de quartzo

A piezoelectricidade é a propriedade que determinados materiais têm de gerarem um campo elétrico ao serem submetidos a deformações ou a pressões exteriores. O efeito piezoelétrico aparece espontaneamente nos cristais naturais que não apresentam centro de simetria [1, 2], como o quartzo, a turmalina e a calcite entre outros. Se o cristal tiver centro de simetria, ao aplicar-se uma pressão homogênea, origina-se uma distribuição também homogênea de cargas, não se produzindo no cristal um dipolo elétrico como o exige o efeito piezoelétrico.

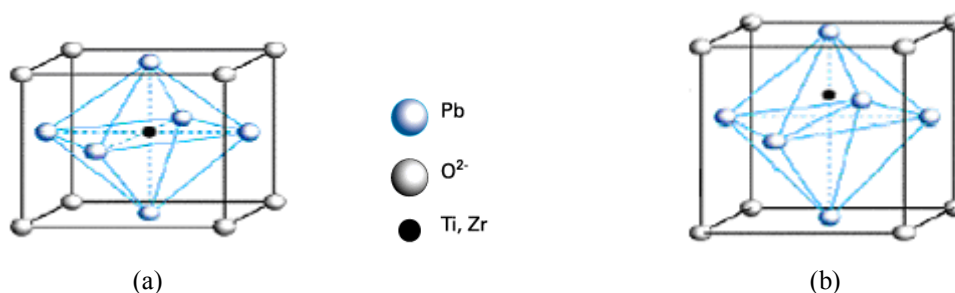


Figura 1 – Célula elementar piezoelétrica (perovskite), (a) antes de polarizar, (b) depois de polarizar

Se qualquer corpo com massa, oscilar a uma determinada frequência, ele oscilará livremente e com maior amplitude ao atingir a frequência que lhe é característica. É deste modo que se comportam os materiais piezoelétricos. Para avaliar as propriedades piezoelétricas dos materiais fazem-se medições das suas frequências características.

Quando o cristal sofre uma pressão, a sua face é deformada de modo que se forma um dipolo momentâneo nas suas moléculas, figura 1. Qualquer material piezoeléctrico que seja submetido a um campo eléctrico sofre alteração nas suas características. Também se verifica o inverso [3], ou seja quando um material piezoeléctrico sofre uma deformação gera-se um campo eléctrico. A este fenómeno pode chamar-se dualidade electro/mecânica. Se a perturbação eléctrica sofrida [4] tiver as características de amplitude e de frequência adequadas, determinadas pela geometria e pelas propriedades do cristal, este oscilará mecanicamente num modo ressonante. Estas condições significam, que um cristal piezoeléctrico pode oscilar no seu modo de cisalhamento (propagação da onda perpendicularmente ao campo eléctrico) devido ao efeito piezoeléctrico reverso.

2.2 – Os Cristais Piezoeléctricos de Quartzo (CPQ)

Há vários tipos de cristais a exibirem o efeito piezoeléctrico, mas as propriedades eléctricas, mecânicas e químicas dos cristais de quartzo, conferem-lhe grande utilização nas aplicações analíticas. Os CPQ são obtidos de um cristal de quartzo simples.

A figura 2 representa o deslocamento cisalhante dos planos do cristal quando se lhe aplica um campo eléctrico perpendicular à sua superfície. No caso do CPQ, o campo eléctrico é aplicado sobre os eléctrodos de ambas as faces do disco.

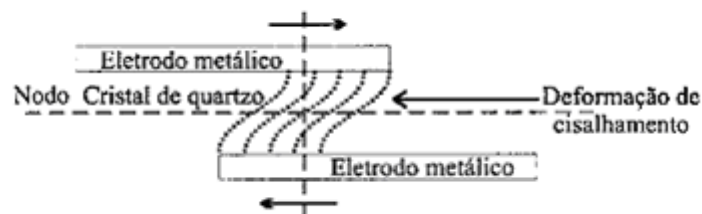


Figura 2 – Nodo dos planos de um cristal de quartzo com a deformação provocada pelo cisalhamento.[4]

Podem-se fazer diversos cortes nos cristais, tendo os seus eixos como orientação. As características da placa extraída dependerão do posicionamento do seu corte em relação aos eixos do cristal. A orientação dos cortes é escolhida de acordo com os fins a que a placa se destina. Para que haja vibração há exclusivamente duas orientações para efectuar os cortes do cristal, a orientação AT e a orientação BT, figura 3. Para a maioria das aplicações analíticas com utilização de cristais piezoelétricos de quartzo, têm sido usados cristais provenientes de cortes AT. Este modo refere-se ao corte das fatias de quartzo a um ângulo de $35^{\circ} 15'$ em relação ao eixo do zz. Os cristais assim cortados, AT, têm uma dependência da temperatura praticamente nula. Assim, estes cristais podem abranger uma gama de frequências estáveis numa estreita faixa de temperaturas.

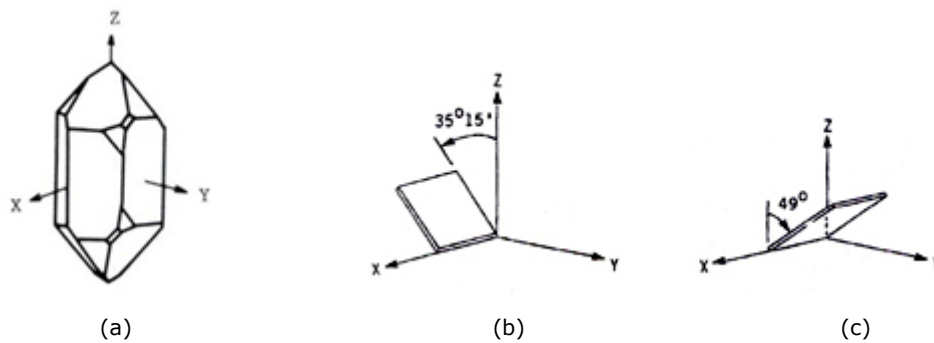


Figura 3 – (a) representação de um cristal de quartzo com os respectivos eixos, (b) orientação do corte AT, (c) orientação do corte BT [5]

Os cristais podem ser obtidos comercialmente com diferentes tratamentos superficiais, podendo ser rugosos ou polidos [4, 6]. Para trabalhar na fase líquida, são recomendados os cristais polidos, para que o líquido não fique retido nas cavidades, o que causaria variações fictícias das frequências. Os cristais, figura 4, têm diâmetros diferentes havendo-os de vários tamanhos. A espessura de um cristal determina a sua frequência de ressonância, e esta, por seu lado, determina a sensibilidade à massa. Dispositivos mais finos têm maiores frequências e são mais sensíveis, mas muito frágeis para manusear.

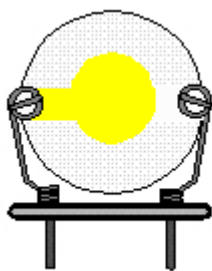


Figura 4 - Aspecto de um cristal de quartzo piezoelétrico com os eléctrodos em ambas as faces.

Os sistemas para a análise em fase gasosa são diferentes dos sistemas para a análise em fase líquida. As aplicações num meio líquido apresentam maior desafio pois há múltiplos fenómenos a ocorrer simultaneamente. O efeito que causa a variação da frequência na fase gasosa, gera uma resposta similar na fase líquida, mas, nesta, há a considerar a variações da densidade e da viscosidade que produzem variações na frequência e uma atenuação do sinal.

A maior desvantagem da microbalança de cristais de quartzo é que cada dispositivo é apenas sensível à substância para que foi preparado.

A sensibilidade de detecção depende da frequência de ressonância e é maior para frequências mais elevadas. Geralmente obtém-se boa sensibilidade com cristais de frequência característica entre os 5 e os 10 MHz, o que indica que estes cristais têm uma boa relação entre a facilidade de manuseamento e a sensibilidade.

A oscilação é máxima no volume correspondente à área abrangida pelos eléctrodos. Os eléctrodos, geralmente de ouro ou de prata, são preparados por evaporação térmica na superfície do quartzo [2]. O cristal é ligado a um circuito oscilador responsável por lhe aplicar um campo eléctrico alternado que provoca uma oscilação no centro do cristal piezoelétrico. Ao oscilador liga-se um frequencímetro para a leitura das variações da frequência de oscilação do cristal. Normalmente, a aquisição dos dados debitados pelo frequencímetro é feita por um computador ligado a este.

Ao ser aplicado um potencial eléctrico alterno ao cristal na direcção X induz-se no cristal um movimento vibracional na direcção Y de acordo com o sinal do potencial eléctrico. A amplitude das vibrações mecânicas resultantes é grande se a frequência de

alternação resultante coincidir com a frequência de ressonância natural do cristal de quartzo. De igual modo, aplicando uma pressão mecânica na direcção Y, aparece uma polarização eléctrica na direcção X e surgem cargas nas faces do cristal. A relação entre estes efeitos é reversível e quase linear [2, 7]. Se for depositada uma massa na superfície do cristal ocorre um decréscimo do movimento de oscilação, o que provoca uma diminuição da frequência da sua vibração. Existem vários modos diferentes de oscilações, mas os mais frequentemente usados são as vibrações longitudinais e de cisalhamento devido ao efeito piezoelétrico reverso. Assim, através do registo da frequência do cristal é possível fazer um estudo dos fenómenos interfaciais e superficiais.

Em geral, é mais importante obter um coeficiente de temperatura igual a zero, do que uma alta actividade piezoelétrica. A fim de obter a máxima estabilidade de frequência deve manter-se o cristal num meio termostaticamente controlado, porque o coeficiente de temperatura é zero apenas dentro de uma gama estreita de temperaturas.

A frequência de vibração do CPQ depende dos parâmetros associados às fases adjacentes ao cristal e das propriedades físicas do próprio cristal, tais como tamanho, corte, densidade e espessura. A relação entre a frequência de ressonância e a massa da substância que cobre o cristal é de grande importância para um método analítico sensível, pois muitas aplicações analíticas utilizam esta relação.

2.3 – Aplicação dos Cristais Piezoelétricos à Detecção de Analitos em Fase Gasosa

Ao usar um CPQ têm-se dois métodos para gerar um sinal. No primeiro método, o mais comum, o próprio cristal é parte de um circuito oscilador. O cristal vibra a uma frequência controlada pelas propriedades do cristal.

No segundo método, o cristal é ligado a um circuito externo que lhe fornece uma voltagem alterna com várias frequências. Aqui, a frequência de vibração não é determinada pelo cristal. O período e a amplitude da frequência do cristal, como resposta a uma excitação eléctrica, são medidos monitorizando os parâmetros do CPQ com um circuito equivalente.

A característica [1] essencial do material piezoeléctrico é a validade das relações lineares entre o campo eléctrico aplicado e a tensão ou a deformação mecânica produzida.

Em 1959, Sauerbrey, [2] desenvolveu uma equação para descrever o decrescimento de frequência provocado pela adição de uma determinada massa à área activa do cristal.

$$\Delta F = \frac{-2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C \Delta m$$

onde:

ΔF = variação da frequência em Hz;

f_0^2 = frequência da ressonância fundamental em Hz;

Δm = variação da massa em g;

A = área piezoelectricamente activa, área da superfície do eléctrodo, em cm^2 ;

μ_q = módulo do corte do quartzo = $2,947 \times 10^{11} \text{ gcm}^{-2}$;

ρ_q = densidade do quartzo = $2,648 \text{ gcm}^{-3}$;

C = constante de sensibilidade de massa, baseado no tipo de cristal usado, em Hzg^{-1} .

O trabalho de Sauerbrey demonstrou que a aplicação de um filme fino na superfície de um CPQ equivale a uma variação da massa do cristal. Sendo a onda do cristal uma sua característica, a deposição de camadas rígidas e muito finas amortecem a sua propagação, o que justifica aquela equação. A variação da frequência de ressonância depende da variação da massa do cristal por unidade de área.

É nesta equação que se baseia a utilização analítica do CPQ. Se uma substância a analisar for adsorvida na superfície do CPQ, é como se se adicionasse massa ao cristal. A variação dessa massa corresponde à variação da frequência de vibração do cristal. A relação de Sauerbrey é baseada na sensibilidade à variação da massa total do cristal. A massa deverá ser uniformemente depositada sobre a superfície do eléctrodo, para se poder aplicar a equação de Sauerbrey. A quantidade de massa a ser depositada na superfície do eléctrodo tem um limite que, logo excedido, impede o cristal de vibrar.

A sensibilidade à massa do analito presente na fase gasosa é determinada pela frequência fundamental do CPQ, como descrito na equação. Esta sensibilidade à massa, aumenta com o aumento da frequência fundamental e com a diminuição da espessura do cristal. Quanto mais finos forem os cristais maior é a frequência e a sensibilidade. A

redução das medidas do cristal só pode ser feita dentro de certos valores sem afectar a sua durabilidade. Os cristais mais comumente usados são discos de quartzo com 10 a 16mm de diâmetro e de 5 a 15 MHz. Para uma frequência fundamental de 10 MHz a superfície do eléctrodo deve ter a área de 0,22 cm² sendo a sensibilidade da massa da fase gasosa de aproximadamente 1 Hz por nanograma.

Para a determinação de analitos em amostras gasosas, a frequência varia em função da massa [6]:

$$\Delta f \propto K\Delta m$$

Com os trabalhos de Sauerbrey e de King [7, 8, 9] desenvolveu-se o primeiro dispositivo piezoelétrico, detector de sorção para alguns hidrocarbonetos. O sistema consistia no emprego de um cristal piezoelétrico de quartzo, modificado, como dispositivo detector, e um outro idêntico, não modificado, usado como dispositivo de referência. Estes conduziram a uma nova espécie de detectores rápidos e selectivos. Com os avanços inicialmente obtidos surgiram diferentes configurações e diferentes mecanismos de interacção entre o sensor e a matéria, resultando inúmeras aplicações nos sistemas que utilizam os CPQ.

2.4 – Aplicações dos Cristais Piezoelétricos à Detecção de Analitos em Fase Líquida

As primeiras aplicações de um CPQ a sistemas na fase líquida [2, 7, 10] não foram bem sucedidas porque os cristais deixavam de vibrar quando imersos numa solução. Entretanto desenvolveram-se sistemas que permitiam a passagem de um fluxo da solução apenas sobre uma das superfícies do cristal.

A primeira aplicação bem sucedida, de um dispositivo CPQ como sensor na fase líquida, foi feita por Konash e Bastiaans [7, 8, 10] que conseguiram obter resultados, utilizando cristais piezoelétricos de quartzo como detectores de massa para cromatografia. Depois, King, em 1964, utilizou um CPQ numa aplicação de química analítica, uma vez que estes cristais já eram utilizados como detectores de hidrocarbonetos em cromatografia

gasosa (GC). Este desenvolvimento possibilitou a superação de dois dos problemas associados ao uso dos CPQ em meio líquido que eram a oscilação estável do cristal e a eliminação dos efeitos provenientes da viscosidade e da densidade do líquido, como se verá.

Quando se imerge um cristal numa solução [6, 7, 11], a frequência da oscilação depende do solvente usado. Para compreender o mecanismo da oscilação do cristal na solução e para o desenvolver como sensor em solução, importa compreender quais os factores que determinam a frequência e como a influenciam.

A frequência de um cristal de quartzo varia muito, quando a sua superfície está em contacto com o líquido de imersão. O cisalhamento do cristal, condiciona o movimento do líquido na sua superfície.

Os estudos de Nomura e Okuhara [12] conduziram a uma equação que relaciona a frequência de ressonância do cristal com a viscosidade e a densidade da solução. Depois destes trabalhos outros grupos de pesquisa [13, 14, 15] comprovaram que, para além da viscosidade e da densidade do líquido, há outros parâmetros a considerar, tais como a estrutura da interface sólido/solução, a condutividade, a polaridade, a temperatura, a uniformidade do filme sobre o cristal e a extensão da área do cristal em contacto com a solução. Estes parâmetros são de grande relevância para a aplicação dos CPQ a meios líquidos.

Temos então [4, 6]:

$$\Delta f = f_0^{3/2} \left(\frac{\rho \eta}{\pi \eta_q \rho_q} \right)^{1/2}$$

onde:

Δf - variação da frequência em Hz;

f_0 – frequência de ressonância fundamental do cristal;

π - representa a constante 3,1416;

ρ - a densidade do líquido;

η - a viscosidade do líquido;

ρ_q - é a densidade do quartzo;

η_q - módulo de cisalhamento do cristal.

A profundidade de penetração desta onda [6] depende exactamente de

$$\lambda = \frac{v}{f_0} = \frac{1}{f_0} \sqrt{\frac{E}{\rho}}$$

Assim, e medindo a variação da frequência de ressonância do sistema, pode-se estudar qualquer camada, fina, que seja colocada na superfície de um cristal.

A microbalança de cristais piezoelétrico de quartzo ou sensor de massa, tem sido reconhecida como sensível, estável, de baixo custo de produção e de simples desenvolvimento.

2.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – Jacintho, C., Furukawa, C., M, *Caracterização de materiais piezoelétricos utilizando um analisador de impedância*, Produção da União Científica da EPUSP, **2002**
- [2] - Bunde, R. L, Jarv. E. J., Rosentreter J. J., *Biossensores de Cristais de Quartzo Piezoelétricos*, Talanta, 46(6), **1998**, 1223-1236
- [3] – Megrich A., *Cristais – Coração dos Circuitos Digitais* Escola de Engenharia Maná, São Paulo
- [4] - Varela H., Malta M., Torresi R., M., *Técnicas in situ de baixo custo em electroquímica: A Microbalança de Cristal de Quartzo*, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de S. Paulo, **2000**
- [5] – O’Sullivan C.K., Guilbault G.G, *Biosensors and Bioelectronics*, 14(8-9), **1999**, 663-670
- [6] – O’Sullivan C.K., Guilbault G.G., *Commercial Quartz Crystal Microbalances – Theory and Applications*, Laboratory of sensor Developement, Department of chemistry, National University of Ireland, *Biosensors & Bioelectronics* 14, 663, **1999**
- [7] - Damos F. S., Mendes, R. K., Kubota, L. T., *Aplicações de QCM, EIS e SPR na Investigação de Superfícies e Interfaces para o Desenvolvimento de (Bio)Sensores*, Quim. Nova, 27(6), **2004**, 970-979
- [8] – Alder, J. F., Drew, P. K. P. , Fielden, P.R. A., *J. Chromatogr., A*, 212(2), **1981**, 167-177
- [9] – King W. H., *Anal. Chem.*, 36(12), **1964**, 1735-1739

- [10] – Konash P.L., Bastiaans G., J., Anal. Chem., 52(12), **1980**, 1929-1931
- [11] - Kanazawa K. K., Gordon J. G., *Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with a Liquid*, Anal. Chem, 57(8), **1985**, 1770-1771
- [12] – Nomura T., Okuhara M., Anal. Chim. Acta, 142, **1982**, 281.
- [13] – Muramatsu H., Dicks J., M., Tamiya E., Karube I., Anal. Chem, 59 (23), **1987**, 2760-2763
- [14] - Yao S.-Z., Zhou T. A., *Dependence of the oscillation frequency of a piezoelectric crystal on the physical parameters of liquids* Anal. Chim. Acta, 212, **1988**, 61-72
- [15] - Hillier A. C.; Ward M. D.; Anal. Chem, 64 (21), **1992**, 2539-2554

3 – O Fungo e o Enxofre Orgânico

3.1 – Os Fungos

3.1.1 – Introdução

Os fungos são um importante grupo de organismos, de que se conhecem mais de 77000 espécies, sendo a maior parte delas terrestres. Pensa-se que deverão existir tantas espécies de fungos como de plantas, mas a maioria dessas espécies não terá ainda sido descrita [1].

Os fungos formam colônias de dois tipos, unicelulares como as leveduras, e multicelulares, as filamentosas [2].

Os fungos multicelulares são constituídos por filamentos microscópicos e ramificados, denominados hifas. O conjunto das hifas forma o micélio. Um fungo filamentoso origina-se a partir de um esporo que se alonga enquanto o núcleo se multiplica por mitoses como mostra o esquema da figura 5. Assim, surge a primeira hifa, que cresce e se ramifica, dando origem ao micélio [3].

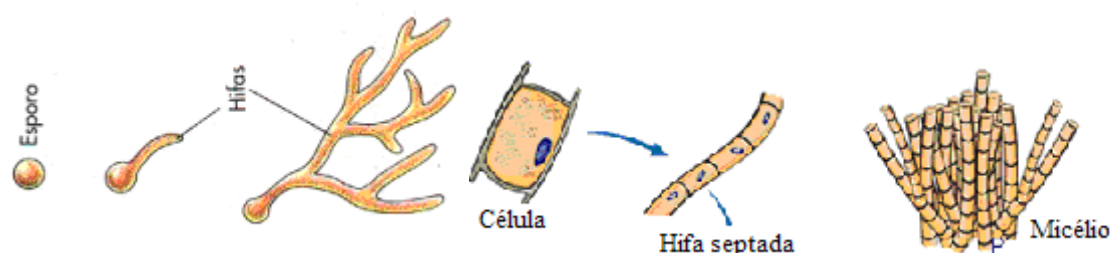


Figura 5 – Esquema do desenvolvimento de um fungo [4]

Há uma subdivisão de funções para as suas diferentes partes estruturais. Uma parte do talo é enterrada na fonte de alimentação. Recebe nutrientes que são transportados através do talo, onde a reprodução pode ocorrer. Em muitos fungos, a porção assimilativa do talo é uma extensão do micélio, formado por uma rede de filamentos, como ilustra o esquema acima. Quando o micélio do fungo se reproduz, diferencia-se uma porção

específica do talo que exerce funções reprodutivas quer sexuadas quer assexuadas. Estas estruturas reprodutivas não assimilam nutrientes, mas são alimentadas através do micélio.

Um aspecto importante da organização do micélio no fungo tem a ver com o transporte dos nutrientes e de outros materiais de uma parte do fungo para a outra. É importante que os nutrientes sejam transportados desde a parte do fungo enterrada na fonte de alimentação para a parte que faz a reprodução e da parte amadurecida do micélio para as hifas, formadas por células alinhadas topo a topo, ramificadas que podem ser septadas ou asseptadas e que podem ainda estar em crescimento.

Alguns fungos possuem hifas septadas, figura 6 (a) e outros hifas não septadas, figura 6 (b), isto é, uma célula numa hifa pode ser ou não separada de uma outra por uma parede ou septo.

As células que formam as hifas são alongadas e são também, geralmente, bi ou multinucleares.

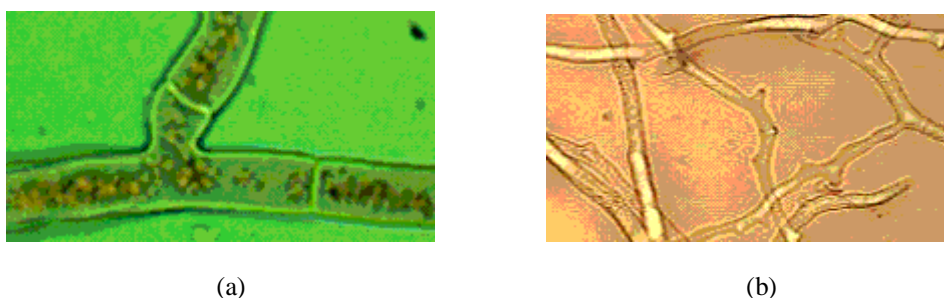


Figura 6 – Aspectos das hifas. Em (a) vê-se que podem ser multinucleares e em (b) a sua forma alongada. Ampliação 400x

3.1.2 – Estrutura das Células

As células da maior parte dos fungos contêm quitina e não celulose, apesar de noutros fungos se verificar o contrário.

As células dos fungos são basicamente semelhantes às células dos animais e das plantas, apesar de terem diferenças fundamentais. As principais características das células

dos fungos são comuns à maioria delas, quer sejam simples células isoladas, células sem hifas ou células reprodutivas não especializadas. Há características comuns tais como a estrutura e a formação de determinados tipos de esporos.

As paredes das células dos fungos são finas podendo haver outras mais espessas. Os principais constituintes das paredes incluem uma variedade de polissacarídeos, que, geralmente, representam 80 a 90% da parede. Outros constituintes importantes são as proteínas, muitas vezes conjugadas com os polissacarídeos, com pequenas quantidades de lípidos e de outras substâncias [5]. Os sacarídeos mais importantes são a quitina (polissacarídeo existente na carapaça de muitos animais, conferindo elevada rigidez e maior resistência à degradação microbiana) [1] e a celulose, ambos polímeros da glucose, cujos esquemas estão representados na figura 7.

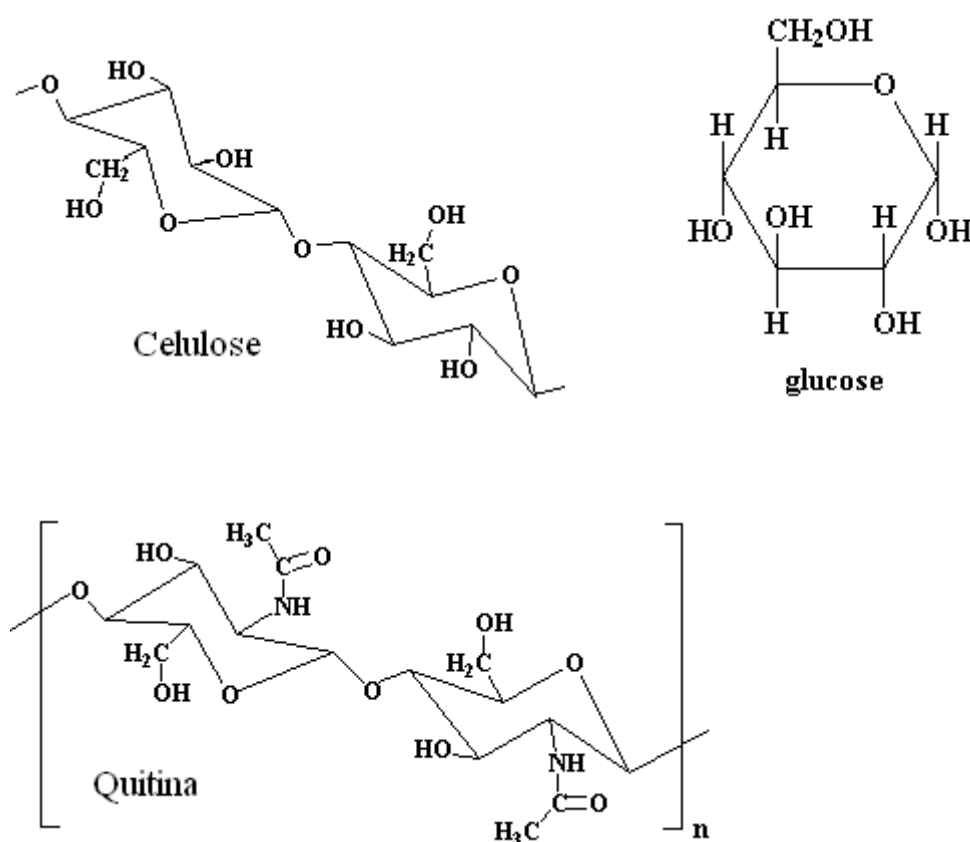


Figura 7 - Estruturas da celulose, da glucose e da quitina

A constituição de um fungo varia conforme as diferentes espécies [5]. Também varia com a idade do fungo, quer porque algumas das substâncias que constituem parte das hifas jovens desaparecem nas mais velhas, ou porque podem incorporar outros materiais que vão mascarar a presença dos constituintes iniciais. Factores como a composição do meio, o pH e a temperatura influenciam a constituição das paredes dos fungos. As microfibras, compostas pela quitina e pela celulose, estão entrelaçadas e embebidas numa matriz amorfa que as cimenta juntas, fornecendo, assim, uma estrutura que confere às paredes a sua forma morfológica. O material da matriz contém glucanas e mananas, polímeros da glucose e da manose, respectivamente. As glucanas são polímeros lineares da glucose unidos por ligações β [6]. A manose é polimerizada como mananas em fungos, bactérias e leveduras [7]. Conclui-se que as paredes de um fungo são formadas por duas ou mais camadas. O suporte do esqueleto de quitina ou de microfibras de celulose ocorre, geralmente, numa só camada, enquanto que as restantes camadas parecem ser homogêneas e formadas principalmente por proteínas amorfas e/ou hidratos de carbono.

3.1.3 – Reprodução

Os fungos podem reproduzir-se por ciclos não sexuais, sexuais e parassexuais [2]. Num fungo a unidade reprodutiva [8] é o esporo que pode conter um ou mais núcleos consoante a sua reprodução é sexual ou não. O esporo é uma estrutura que pode ser separada do seu talo e disseminada.

A reprodução assexuada [2] pode dar-se de quatro modos:

- fragmentação de artroconídios;
- fissão de células somáticas, ou mitótica do núcleo haplóide, [3] (que contém apenas um cromossoma de cada par de homólogos);
- brotamento ou gemulação (modo de divisão celular que se observa nas leveduras) de blastoconídios –mãe, isto é, por separação das hifas;
- produção de conídios, o modo mais comum da reprodução assexuada. Os conídios são produzidos pelas transformações do sistema vegetativo do próprio micélio.

A reprodução do fungo em estudo, fez-se sempre por separação de hifas.

A reprodução sexuada pode envolver a união de duas hifas que crescem em direcção uma à outra transportando um núcleo na extremidade [1, 2, 8]. Quando estas se tocam, as paredes são dissolvidas por enzimas e formam-se septos que isolam os núcleos nas extremidades, originando gametângios [1] (gametângia, estrutura celular simples que produz gâmetas, células sexuais ou núcleos gaméticos).

A fusão dos núcleos, gâmetas, origina uma célula diplóide (que contém os cromossomas aos pares – cromossomas homólogos), o zigoto, que irá desenvolver uma espessa parede de protecção, zigósporo. Quer este zigoto seja haploide, (contendo apenas um cromossoma de cada par) quer seja diploide, pode sofrer meiose originando um novo micélio haploide.

Alguns fungos não se reproduzem nem por gâmetas nem por gametângia e, por vezes, não se pode saber se existe ou não plasmogamia entre as hifas.

Em cada fungo, dá-se a reprodução sexual mesmo na ausência aparente de órgãos sexuais ou de plasmogamia. O uso do termo reprodução sexual no caso dos fungos, implica que ocorre cariogamia ou meiose.

A parassexualidade consiste na fusão das hifas.

3.1.4 – Nutrição

Como se disse em 3.1.2, a maior parte dos fungos têm quitina nas suas células e não celulose, enquanto noutros fungos se verifica o contrário [1]. A presença da parede impede-os de realizar fagocitose (processo pelo qual a célula engloba, no seu citoplasma, partículas sólidas). Então eles libertam enzimas hidrolíticas para o exterior do corpo para digerir os nutrientes que depois absorvem.

Esta situação permite entender melhor o motivo porque os fungos tomam a forma de micélio, pois, sem esta estrutura, não teriam uma relação área/volume suficientemente elevada para se alimentarem eficazmente. A estrutura do micélio facilita a aquisição dos alimentos, pois estende-se com facilidade em todas as direcções sobre o substrato.

3.1.5 – Crescimento

Todos os organismos vivos têm um potencial para aumentarem a sua massa, o que passa por divisão celular, por alargamento da célula ou por ambos. O aumento de massa é chamado crescimento. As regras que regem o crescimento são conformes aos diversos organismos. O crescimento da célula acompanhado da divisão nuclear e da síntese do citoplasma, é responsável pelo crescimento do fungo multinucleado [8, 9]. O fungo micelial, como outros organismos complexos multicelulares, crescem através da combinação, da divisão e da amplificação das células.

3.1.6 – Medida do Crescimento do Fungo

Um método muito simples de avaliar o crescimento do fungo é através de uma medida linear [8] que consiste na observação da variação do raio do desenvolvimento da colónia no meio, durante um determinado período de tempo. Estes métodos, que têm a virtude de serem extremamente simples, dão o valor aproximado do crescimento, são não destrutivos e permitem fazer mais medições num mesmo micélio. Ficam por avaliar as diferentes áreas do micélio submerso no meio.

O método mais preciso de analisar o crescimento do fungo é por meio do peso seco ganho. Inoculando o fungo em meio líquido, depois do período de crescimento separa-se o micélio resultante por filtração ou centrifugação, seca-se e pesa-se.

O crescimento de um fungo pode também ser observado pela variação da absorção da luz através do meio de cultura líquido.

3.1.7 – Crescimento de um Fungo numa Cultura

Geralmente o crescimento dos fungos, tais como os saprófitas, organismos que se alimentam de matéria orgânica, ou os parasitas, ocorre naturalmente tanto em produtos animais como em plantas, materiais muito complexos que fornecem um número desconhecido de nutrientes para o crescimento dos fungos. É extremamente inconveniente ou impossível para os micologistas estudar a fisiologia dos fungos no seu habitat natural [8, 10, 11], sendo desejável a cultura dos fungos no laboratório sob condições em que tanto os factores nutricionais e de desenvolvimentos possam ser controlados e repetidos, como as condições físicas (T, mistura, pH e luminosidade) possam ser convenientemente ajustadas.

A primeira condição para a cultura em laboratório é a escolha do substrato, que tem de ser semelhante àquele que o fungo tem quando ocorre na natureza.

3.1.8 – Exigências Nutricionais para o Crescimento

No crescimento, os fungos estão directamente em contacto com os seus nutrientes. Pequenas moléculas (como açúcares simples e aminoácidos), que envolvem a hifa em solução aquosa, podem ser directamente absorvidas por ela. Polímeros maiores insolúveis, como a celulose e a goma, têm de ser previamente digeridos para poderem ser absorvidos [8, 10, 11].

Assim, para serem absorvidas pelo fungo, as moléculas muito grandes são, primeiro, atacadas por enzimas extra celulares que as fraccionam. Como todas as enzimas digestivas, também as enzimas dos fungos controlam as reacções de hidrólise que fraccionam as moléculas grandes em componentes simples.

As enzimas digestivas estão aptas para controlar a hidrólise de apenas determinadas moléculas. A digestão completa dos polímeros maiores dá-se por processos

que envolvem diferentes enzimas que os transformam em moléculas simples e solúveis. Depois de absorvidas pela célula, estas pequenas moléculas são então digeridas, com a ajuda de enzimas intra celulares.

No esquema seguinte, figura 8 pode ver-se a fragmentação das moléculas maiores e a captação dos produtos menores pela hifa de um fungo [8, 10, 11].

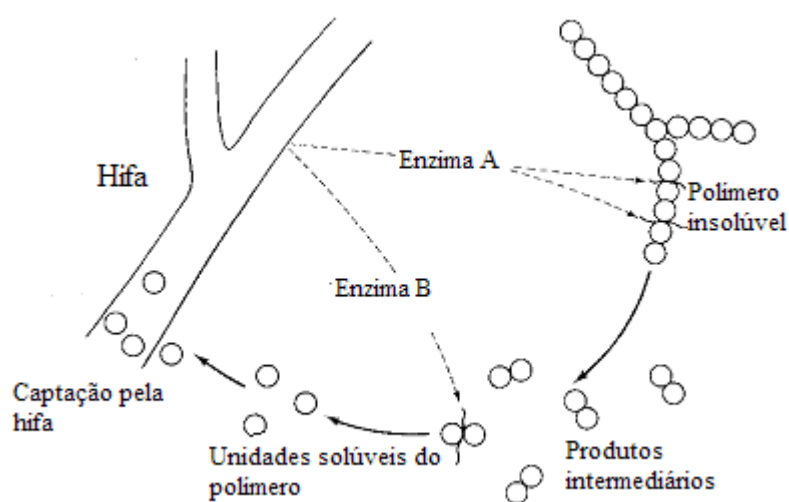


Figura 8 – Esquema da alimentação de um fungo por fraccionamento dos polímeros

O crescimento de um fungo ocorre igualmente bem num meio que contenha os nutrientes necessários, quer simples quer complexos. Este facto torna-se impossível se o fungo em questão não dispuser das enzimas necessárias, o que o torna incapaz de crescer num meio que contenha um substrato que não consiga digerir.

3.1.9 – Captação

Os iões e as moléculas que entram na célula de um fungo passam através da parede da célula e do plasmalemma (por dentro da parede da célula, o protoplasma é rodeado pelo *plasmalemma*, a membrana do plasma, semelhante à de outros organismos), membrana que consiste maioritariamente em lípidos e em proteínas. Os poros da membrana só permitem a passagem de iões e de moléculas simples. O movimento destas unidades numa solução de um não electrólito está dependente da concentração da solução movendo-se do lado de maior para o de menor concentração de soluto, mas numa solução de um electrólito a direcção das partículas está condicionada pela diferença do potencial electroquímico [8, 10, 11].

3.1.10 – Elementos Essenciais

Alguns elementos são essenciais ao crescimento dos fungos. Se um elemento essencial faltar no meio ou no substrato, o fungo não sobrevive mesmo que existam outros elementos [8, 10, 11].

Normalmente, são o micélio e os esporos que se analisam para saber quais os elementos presentes. Se forem sempre encontrados elementos (tais como o carbono, o azoto ou o potássio) independentemente da composição do meio onde o fungo cresceu, pode assumir-se que esses elementos são essenciais para o crescimento de um fungo. Também se podem fazer estudos nutricionais com meio sintético, dos quais são eliminados, um de cada vez, os elementos em questão. Se o fungo não crescer quando, por exemplo o enxofre for eliminado, conclui-se que o enxofre é essencial.

Fazem parte da composição de quase todo o micélio do fungo elementos não metálicos, tais como carbono, azoto, hidrogénio, oxigénio, enxofre e fósforo, e elementos metálicos tais como potássio e magnésio. Estes são os macro elementos que são exigidos pelos fungos em maiores quantidades. O carbono, o azoto, o hidrogénio e o oxigénio são utilizados na formação das paredes dos fungos e todos estes elementos têm uma função no

metabolismo. O hidrogénio é obtido da água ou da metabolização dos compostos orgânicos. O oxigénio é da atmosfera durante a respiração.

São requeridos pelos fungos compostos de carbono - os hidratos de carbono, os monossacarídeos e os e seus derivados - de azoto - os nitratos, os nitritos, o amónio, o azoto orgânico - e de enxofre, bem como o fósforo, o potássio e o magnésio mas estes, em pequenas quantidades. Há microelementos essenciais, os elementos metálicos exigidos pelos fungos em quantidades mínimas, como o ferro, o zinco, o cobre, o manganésio, o molibdénio, e o cálcio ou o estrôncio. Um determinado fungo pode exigir algum destes elementos que todavia possa ser perfeitamente dispensado por outros fungos

3.1.11 – O Metabolismo

O destino dos alimentos não termina com a digestão preliminar e com a sua entrada na célula, por ainda estarem envolvidos processos de metabolismo dentro da célula. O metabolismo processa-se normalmente em dois passos:

- catabolismo que degrada a substância para formas mais simples;
- anabolismo, processo pelo qual a célula sintetiza os seus componentes.

Os processos sintéticos incluem a formação de hidratos de carbono, de proteínas, de lípidos e de lipoproteínas que são comuns a todas as formas de vida. Além dos processos metabólicos que ocorrem no fungo, há ainda a considerar o metabolismo do carbono, do azoto e dos lípidos [9].

Para tornar o substrato assimilável, os fungos produzem enzimas, lipases, invertases, lactases, proteínases, amilases etc., que hidrolisam o substrato através de mecanismos de transporte activo ou passivo. Alguns substratos podem ainda induzir a formação de enzimas que os degradam [8]. Outros fungos hidrolisam substâncias orgânicas, como a quitina, o osso e o couro.

Por diferentes processos, os fungos podem elaborar vários metabólitos como antibióticos, sendo a penicilina o mais conhecido, e micotoxinas, como aflatoxinas, que lhes conferem vantagens selectivas.

Um dos principais problemas dos seres vivos é a obtenção de energia para as suas actividades [9]. Os organismos retiram energia das mais diversas moléculas orgânicas, como por exemplo, açúcares, aminoácidos, ácidos gordos, etc..

3.2 – O Fungo *Sporothrix* e o Enxofre

3.2.1 – O fungo *Sporothrix*

Segundo a classificação taxonómica, [12] o fungo *Sporothrix*, pertence ao género *Sporotrichum*, à família Corticiaceae, à ordem dos Stereales, classe Hymenomycetes, filo Basidiomycota e reino dos fungos. Deste fungo há várias espécies [11] *catenata*, *curviconia*, *cyanescens*, *foliorum*, *fungorum*, *ghanensis*, *guttuliformis*, *inflata*, *insectorum*, *inustatiramosa*, *nivea*, *pallida*, *ramosissima*, *ranii*, *rectidentata*, *schneckii*, e *sclerotialis*. O *Sporothrix schneckii* é a espécie mais comum, logo seguida pelo *Sporothrix cyanescens*, pelo *Sporothrix pruinosum* [12] e pelo *Sporothrix inflata* de Hoog [18].

O *Sporothrix* é um fungo filamentoso, dimórfico, muito vulgar, isolado do solo, vive nas plantas, nas madeiras e na turfa, decompondo-as. Cresce de forma filamentosa [13] a temperaturas inferiores a 37°C e em forma de leveduras a 37°C. A forma filamentosa apresenta colónias de crescimento lento, cerca de 7 dias, são inicialmente claras, convertendo-se posteriormente em colónias duras e enrugadas de cor castanha ou negra, na sua totalidade ou por zonas, devido à produção de conídias pigmentadas (esporos assexuados).

3.2.2. - O Fungo *Sporothrix* e o Enxofre

No ciclo natural do enxofre e ao longo do tempo, a espécie H_2S tem sido designada [14] como o veículo de transferência do enxofre da água para o solo. Pesquisas recentes [14], referem que, concentrações mais baixas de H_2S na atmosfera, e estados redox elevados na água do mar, não permitem a existência de concentrações adequadas de sulfureto de hidrogénio para sustentar o equilíbrio atmosférico. Por outro lado, têm sido encontradas na água natural e no solo elevadas concentrações de compostos de enxofre orgânico voláteis, principalmente sob a forma de dimetil sulfureto, de tal modo que o H_2S atmosférico se considera proveniente dos derivados gasosos deste enxofre orgânico. Estes compostos estão ainda envolvidos noutros fenómenos que têm ganho relevância nos últimos anos, como o aumento da poluição proveniente da actividade industrial, a industrialização, a deterioração de construções e de monumentos, etc.

Este microfungo tem um fraco crescimento se estiver a ser alimentado num meio em que não haja um mínimo de compostos com os elementos $-S-C-$ e $-C-S-C-$ [14]. Devido a este facto, este microfungo tem sido considerado adequado para o papel de detector biológico, para determinar a presença de traços de compostos com o grupo tio-éter no solo, na água e na atmosfera.

Este microorganismo, fungo dimórfico [15], se cultivado a $37^\circ C$, torna-se numa levedura e o seu crescimento em meio líquido pode ser avaliado pela densidade óptica a 600 nm.

Como descrito, tenta-se estudar o metabolismo dos compostos de enxofre orgânico por este microfungo. Este microorganismo foi previamente estudado nas suas características morfológicas, sendo caracterizado pela produção de duas espécies de frutificações assexuadas, por exemplo, *Humicola* [14] como clamidosporos em tamanho [16] (esporos produzidos assexualmente resultando de modificações estruturais de segmentos de hifas existentes), figura 9 (a) e *Sporothrix* [14] como blastoconídia em tamanho [17] (como as células de levedura, mas alongadas), figura 9 (b).

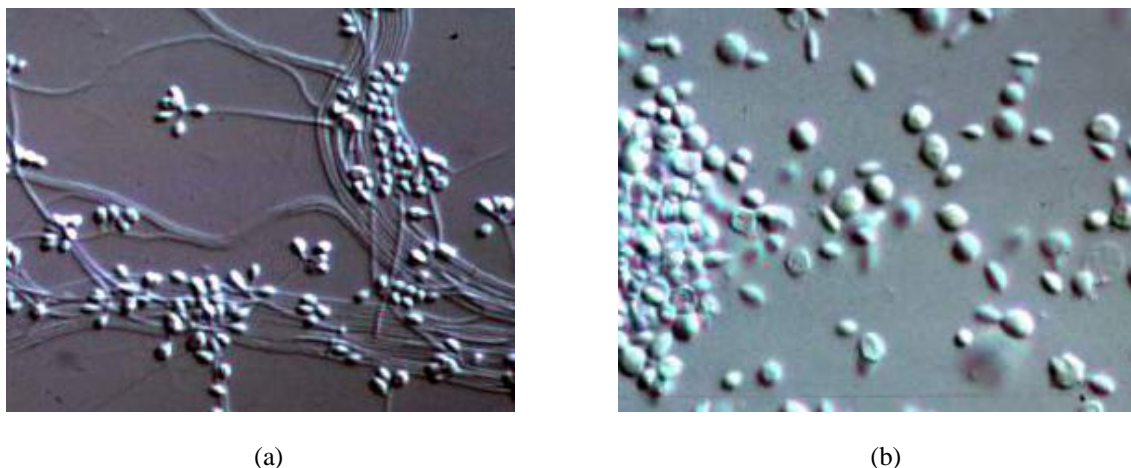


Figura 9 – O microfungo na forma dos clamidosporos (a) e na forma de blastoconídia (b)

Neste estudo interessa conhecer, tanto quanto possível, a carência dos fungos, e em particular a do *Sporothrix*, pelo enxofre.

O enxofre exigido pelos fungos [8] é-lhes fornecido por incorporação do ião sulfato no meio, sob a forma de sulfato de magnésio, o que normalmente se faz nas culturas. O fungo reduz o ião sulfato por um mecanismo desconhecido e metaboliza os compostos de enxofre que lhe são necessários, através do enxofre reduzido. Os compostos de enxofre detectados nos fungos incluem aminoácidos (cisteína, cistina e metionina), glutathione tripeptídica, vitaminas (tiamina e biotina), antibióticos (penicilina e gliotoxina) e outros compostos.

Alguns fungos são incapazes de reduzir o ião sulfato e preferem o enxofre reduzido [8]. Outros fungos são capazes de utilizar o sulfato que entra na célula por transporte activo [10]. O enxofre, depois de incorporado como ião sulfato, pode também ser convertido em fosfossulfato de adenosina (um transportador de energia nas células vivas) [10]. A alguns fungos, entre os quais os da família do *Sporothrix* bem como o *Blastocladales* e o *Myxomycete Physarum* tem de se lhes fornecer enxofre no estado orgânico, por exemplo, através do aminoácido metionina [10]. Outros ainda, têm capacidade para utilizar o enxofre orgânico apesar de não o exigirem na sua alimentação. O enxofre reduzido pode ser fornecido como cisteína, cistina, glutathione e metionina, embora os fungos possam utilizar melhor uma forma do que outra.

Por outro lado, o enxofre elementar [10] foi um dos primeiros fungicidas a ser introduzido e é ainda utilizado comercialmente para prevenir as infecções causadas por um mofo pulverulento, como as da uva e as da videira. As plantas podem ser polvilhadas com o pó finamente dividido ou pulverizadas com suspensões coloidais ou outras formações de enxofre. O enxofre pode aceitar electrões do citocromo b interferindo assim com o transporte dos electrões e o fornecimento da energia necessária à vida da célula do fungo. Deste modo, o enxofre começa a reduzir-se para a forma de sulfureto de hidrogénio, que é muito tóxico, e pode produzir sulfuretos de metais, insolúveis, que actuam como co-factores para muitas enzimas afectando o metabolismo de diversas formas.

O dióxido de enxofre é muito usado para prevenir o estrago de vinhos e de sumos de frutas por fermentos. Pode ser adicionado directamente como dióxido de enxofre ou como sais de sulfito e de iões bissulfito. Todos formam em solução uma mistura de dióxido de enxofre e de iões sulfito, SO_3^{2-} e de bissulfito, HSO_3^- , dependendo do pH da solução.

3.3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - <http://curlygirl.no.sapo.pt/fungi.htm>
- [2] - http://www.esec-frei-heitor-pinto.rcts.pt/link8/WebBiologia12/Fungi_1.htm
- [3] - Varela H., Malta M., Torresi R., M., *Técnicas in Siitu de Baixo Custo em Electroquímica: A Microbalança de Cristal de Quartzo*, Instituto de química de São Carlos, Universidade de S. Paulo, **2000**
- [4] – http://www.esec.frei-heitor-pinto.rcts.pt/link8/webBiologia12/fungi_1htm
- [5] – Saens, Peña, Chaco, *Hipertextos del Área de la Biología*, Universidade do Nordeste, Fac. De Agro-indústrias, Faculdade de Ciências Agrárias, Corrientes, Republica Argentina, **1998-2004**
- [6] - Tizard I R., Carpenter R. H., McAnalley B. H, and Kemp M. C., *The Biological Activities of Mannans and Related Complex Carbohydrates*, Department of Veterinary Microbiology and Parasitology, College of Veterinary Medicine. Texas A&M University, College Station, TX, and t Carrington Laboratories, Inc. Irving, TX, USA
- [7] – Conn & Stumpf, 1980; Andriguetto et al., 1986; Lehninger, 1986; Vasconcellos, 1993 e Nunes, , *Carbohidratos*, **1998**
- [8] – Moore-Landrcker, E., *Fundamentals of the fungi*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, **1982**
- [9] – “Metabolismo energético”
<file:///c:/Documents%20and%20Settings/a/Os%20meus%20documentos/Retalhos/energia%20METABOLISMO.htm>

[10] – Carlile M. J., Watkinson S. C., *The fungi*, Academic Press, Hartcourt Brace & Company, Publishers, London, **1997**

[11] - <http://www5.cabri.org/CABRI/home/HyperCat/fun/allindfunS.html> Espécies

[12] – <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Sporotrichum.htm>, “*Sporotrichum spp*”, (described by Link ex Gray in 1821)

[13]- Ardite J. A., *Sporothrix schenckii*, Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat (Barcelona).

[14] –Lepidi A.A., Nuti M. P., Filippi C., *A particular thio-ether group requiring microfungus and its utilization for the detection of organic sulphur compounds in soil, water and atmosphere*, Ann. Micr.23 (75) **1973**

[15] – <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Sporothrix.htm>, “*Sporotrix spp*”, (described by Hektoen and Perkins in 1900)

[16] - Mycologia, 89 (5), **1997**,. 793-800

[17] - inforum.insite.com.br/12650/1167633.html

[18] – “Fungi, Yeast, and Yeast Genetic Stock”,
<http://www.atcc.org/Search/Catalogs/longview.ctm?view=ly,4492364,24605&text=24605>

4 – Biossensores

4.1 – Os Biossensores e as Suas Características

Os sensores químicos [1] são dispositivos que transformam informações químicas, como variações de concentração de alguma espécie de interesse, num sinal analiticamente útil. Tais dispositivos contêm duas unidades básicas funcionais, um receptor e um transdutor. O receptor é a unidade onde a informação é transformada numa forma de energia que possa ser medida pelo transdutor. O transdutor converte a energia de saída do receptor num sinal de interesse analítico, em que a sua grandeza é uma medida da quantidade de analito.

O receptor é responsável pela selectividade do sensor. Estes dispositivos têm o nome de biossensores quando a sua unidade receptora consiste em materiais bioactivos como enzimas, fungos, tecidos, etc e estão ligados a transdutores adequados. Incorporam um ou mais elementos biológicos para produzirem sinais electrónicos proporcionais a determinadas concentrações.

Os biossensores [2] consideram-se instrumentos analíticos que consistem em material biológico activo, usado em conjugação com um dispositivo que converte o sinal bioquímico num sinal eléctrico quantificável. Na figura 10 está representada um esquema simplificado de um biossensor, [3].

Estes instrumentos, os biossensores, [4] detectam, transmitem e registam informação relativa a variações fisiológicas ou bioquímicas.

A característica fundamental é a selectividade da superfície activa que consiste numa espécie biológica. Têm a função de detectar e analisar [3] tanto quantitativa como qualitativamente a presença de certas moléculas [5], em determinados meios, com elevada selectividade, baseada no reconhecimento molecular. Para isso, o biossensor possui sempre no seu conjunto um sistema de reconhecimento biológico que o diferencia de qualquer outro tipo de sensor.

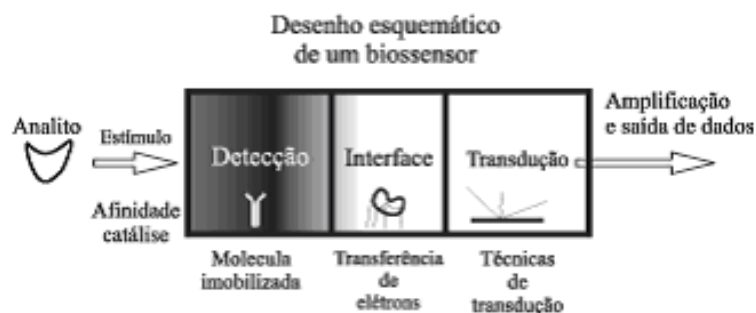


Figura 10 – Esquema simplificado de um biossensor [3]

A função de um biossensor depende da especificidade bioquímica do material biológico activo. A selecção depende do analito ou dos compostos químicos a serem detectados. Os maiores atributos de um bom sistema de biossensores são a especificidade, a sensibilidade, a fiabilidade, o fácil manuseamento, a capacidade de trabalhar mesmo em soluções opticamente opacas, a realização de análises em tempo real e a simplicidade da operação.

Os biossensores [4] podem utilizar uma variedade de transdutores tais como electroquímicos, ópticos, acústicos e electrónicos.

4.2 – Estado da Arte

As enzimas purificadas [4] têm sido muito usadas na construção de biossensores devido à sua elevada actividade específica, bem como à elevada especificidade analítica. Contudo, as enzimas purificadas são caras e instáveis, o que limita as suas aplicações.

As células inteiras têm sido também muito usadas e têm importância considerável no desenvolvimento de biossensores. Os micróbios metabolizam vários compostos orgânicos, quer aerobicamente, quer anaerobicamente, resultando desse metabolismo vários produtos como a amónia, o dióxido de carbono, etc.

Os micróbios têm vantagens especiais como material sensível [4] no fabrico de vários sensores. Estão sempre presentes e são capazes de metabolizar um elevado número de compostos químicos. Os microorganismos têm uma grande facilidade de se adaptarem a

condições adversas e desenvolvem a capacidade de degradar novas moléculas ao longo do tempo.

A maior limitação [4] no uso de células inteiras é a difusão do substrato e de outros produtos através da parede da célula, resultando uma resposta lenta comparada com a do sensor baseado em enzimas. Também têm menor especificidade quando comparadas com os sensores que contêm enzimas puras.

É essencial a escolha da espécie microbiológica utilizada nos biossensores bem como a selecção de uma cultura apropriada, em conformidade com as características do substrato presente na amostra.

Tanto quanto é do nosso conhecimento não foram ainda desenvolvidos biossensores baseados em fungos.

4.3 – Utilização de Cristais Piezoeléctricos como Biossensores

A utilização de cristais piezoeléctricos como biossensores supõe a realização de alguns passos prévios.

Geralmente, mede-se a frequência do cristal, limpo e depois de revestido com a espécie biológica imobilizada [6]. O cristal assim preparado põe-se em contacto com a solução a estudar até que a espécie imobilizada reaja, na solução, com a substância de interesse analítico, durante o tempo que permite que o analito se ligue à espécie biológica imobilizada.

Neste processo a espécie imobilizada interage com o analito em solução com que tem afinidade. Este composto ao interagir com a espécie biológica contribui para o aumento da massa do cristal que se reflecte na diminuição da frequência lida anteriormente. O CPQ é então removido da solução, lavado e seco. Este método não fornece os dados em tempo real.

O segundo modo evita estas limitações. Utiliza-se um fluxo sobre a célula do CPQ ou outro tipo de reacções a ocorrerem na superfície do CPQ a fim de, os dados, serem fornecidos em tempo real. A análise faz-se na fase de solução. A adsorção do analito na

superfície do CPQ causa uma variação das propriedades viscoelásticas da estrutura interfacial que são reconhecidas por uma variação da frequência de ressonância.

4.4 – Imobilização de Biomateriais

Nos biossensores, o cristal piezoelétrico é revestido com uma espécie biológica que interacciona com a substância a analisar, com que tem afinidade química ou física.

Para imobilizar uma espécie biológica na superfície de um cristal é necessário utilizar uma substância inerte, que não interaja com a substância a analisar.

A exigência básica de um biossensor [4] é que o material biológico lhe forneça as variações físico-químicas na proximidade de um transdutor. Assim, as técnicas de imobilização têm um papel fundamental. A imobilização não só ajuda a manter a proximidade entre a espécie biológica e o transdutor, mas também o pode estabilizar para ser reutilizado. A espécie biológica deve ser imobilizada directamente sobre o transdutor ou, em muitos casos, em membranas que são depois instaladas no transdutor.

Há várias maneiras de imobilizar os biomateriais, quer por adsorção, retenção no interior, ligação covalente, reticulação ou a combinação de todas estas técnicas.

A selecção e/ou o suporte das técnicas dependem da natureza do biomaterial e do substrato, bem como do transdutor a utilizar. A escolha do suporte e das técnicas para a preparação das membranas é condicionada pela resistência da membrana.

A reticulação usa reagentes bifuncionais tais como o glutaraldeído (líquido solúvel em água e em etanol, muito reactivo e que pode polimerizar na presença da água) que tem sido usado na imobilização de células em vários suportes.

As técnicas de retenção e de adsorção, são mais usadas nas células mais próximas da superfície do transdutor.

4.5 - Imobilização do *Sporothrix*

Uma vez conseguido o fungo tinha de se construir um sensor que detectasse enxofre orgânico. Para o efeito teria de se colocar o fungo sobre o eléctrodo de um cristal piezoeléctrico, pelo que seria necessário imobilizar o microorganismo sobre o respectivo eléctrodo.

Havendo trabalhos que descrevem a utilização do alginato para a imobilização de fungos [7, 8, 9, 10, 11] de enzimas [12] e de leveduras[13], foi este o método escolhido para a imobilização do fungo no eléctrodo do cristal piezoeléctrico de quartzo.

4.6 – O Alginato de Sódio

O alginato é produzido a partir das algas castanhas. A sua unidade estrutural encontra-se representada na figura 11 [14]:

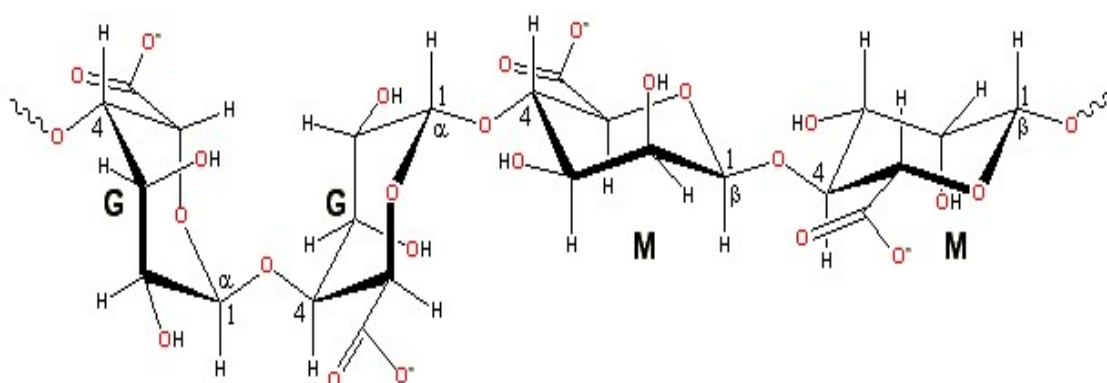


Figura 11 – Representação da estrutura do alginato [14]

Os alginatos são polímeros lineares não ramificados, a que se ligam unidades monoméricas, os ácidos urónicos (açúcares onde o grupo CH₂OH do C₆ foi substituído por um grupo COOH). Estas unidades são resíduos dos ácidos D-manurónico (M), que deriva

da D-manose, e L-gulurónico (G), derivado da L-gulose [15] e epímero do anterior, figura 12. Os açúcares cuja configuração difere num átomo de carbono são epímeros entre eles. A fórmula química do alginato é $(C_6H_7NaO_6)_n$ e a massa molecular média característica é de 10 000 a 600 000 [16, 17].

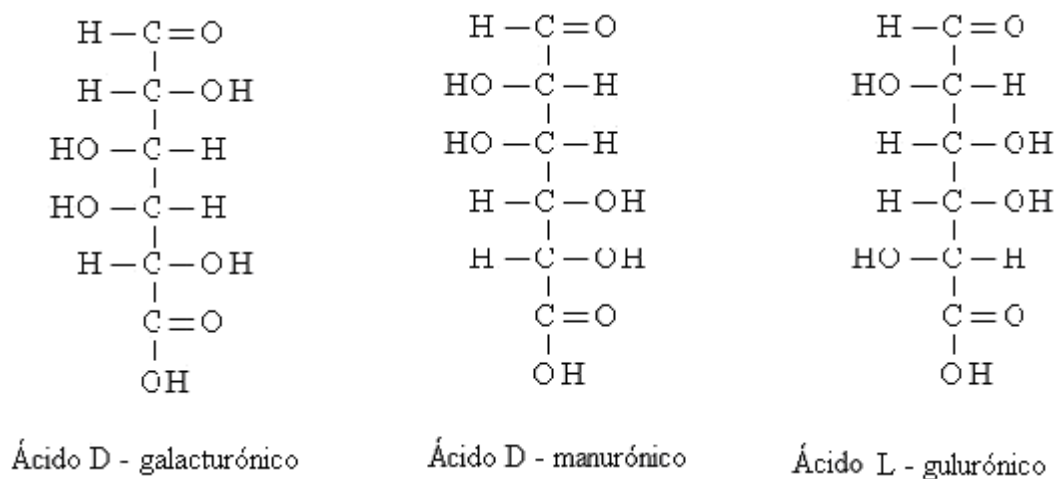


Figura 12 – Representação das estruturas dos ácidos D-galacturónico, D-manurónico e Lgulurónico [78]

Apesar de estes resíduos serem epiméricos, devido aos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e do hidrogénio, [18] os resíduos do ácido D-manurónico, depois da polimerização, começam a ser convertidos em L-gulurónico e, apesar de diferirem apenas em 5 carbonos, têm conformações muito diferentes.

4.6.1.- A Estrutura Molecular e as Propriedades do Alginato de Sódio

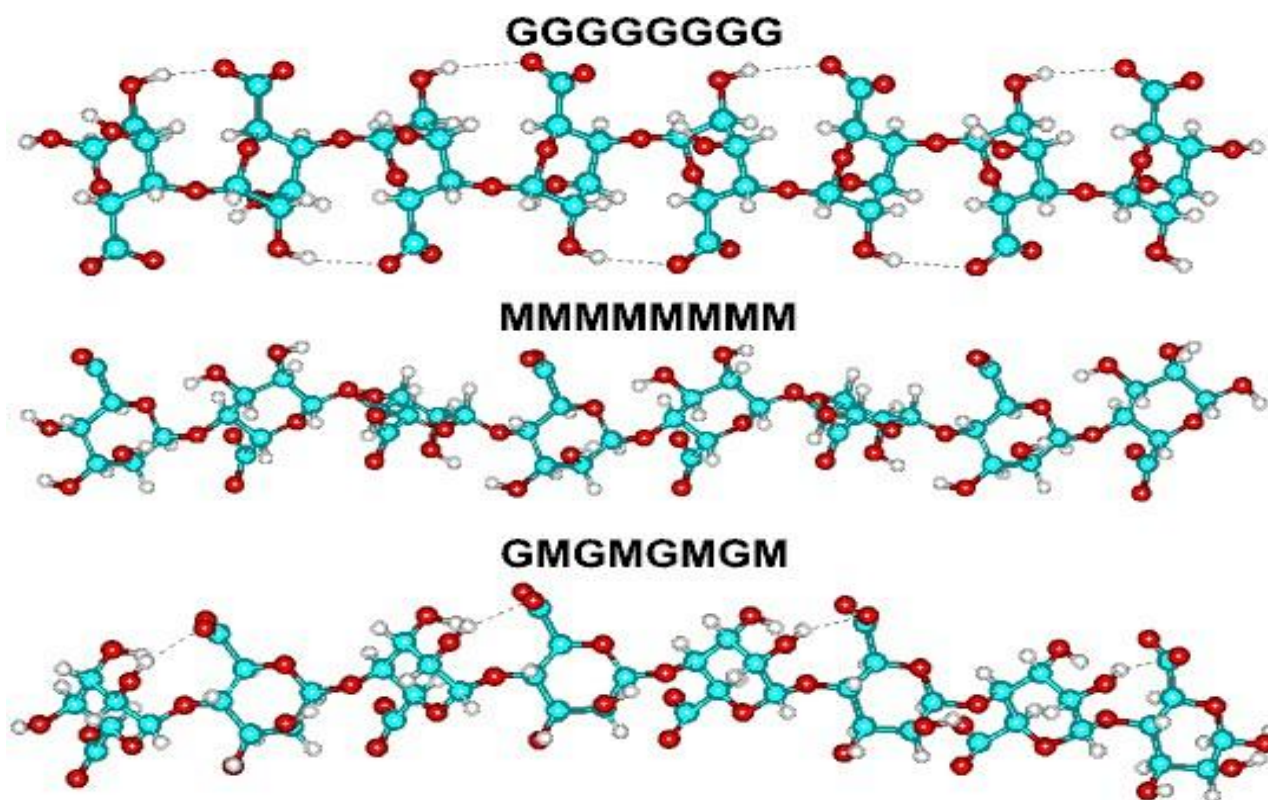


Figura 13 – Estrutura dos alginatos [14]

Os alginatos não são copolímeros acidentais, mas, consoante a fonte das algas que lhes dão origem, consistem, quer em blocos de resíduos semelhantes, figura 13, homopolímeros, MMMM, GGGG, quer em sequência alternada uniforme, heteropolímeros por exemplo GMGMGM, como mostram os esquemas acima, tendo cada um deles diferentes conformações e diferentes comportamentos.

As principais propriedades dos alginatos são a viscosidade e a capacidade gelificante.

As propriedades individuais destes compostos são determinadas pela distribuição dos respectivos blocos. A configuração estrutural é uma das características mais importantes dos alginatos [17]. Ao reagirem, intra ou inter-molecularmente, com catiões

polivalentes que como o cálcio, se introduzem nos espaços formados pelos blocos levantados e com a configuração de tira do ácido gluconórico, formam uma estrutura conhecida como “caixa de ovos”, figura 14 [17, 14]

Quando as cadeias dos polímeros se unem, aumenta o peso molecular, o volume das moléculas e, conseqüentemente, a viscosidade.

A viscosidade das soluções dos alginatos depende do tamanho das moléculas. Para a mesma concentração, quanto maior for a cadeia, maior será a viscosidade [17].

Ao dissolverem-se na água, as moléculas hidratam-se aumentando a viscosidade da solução.

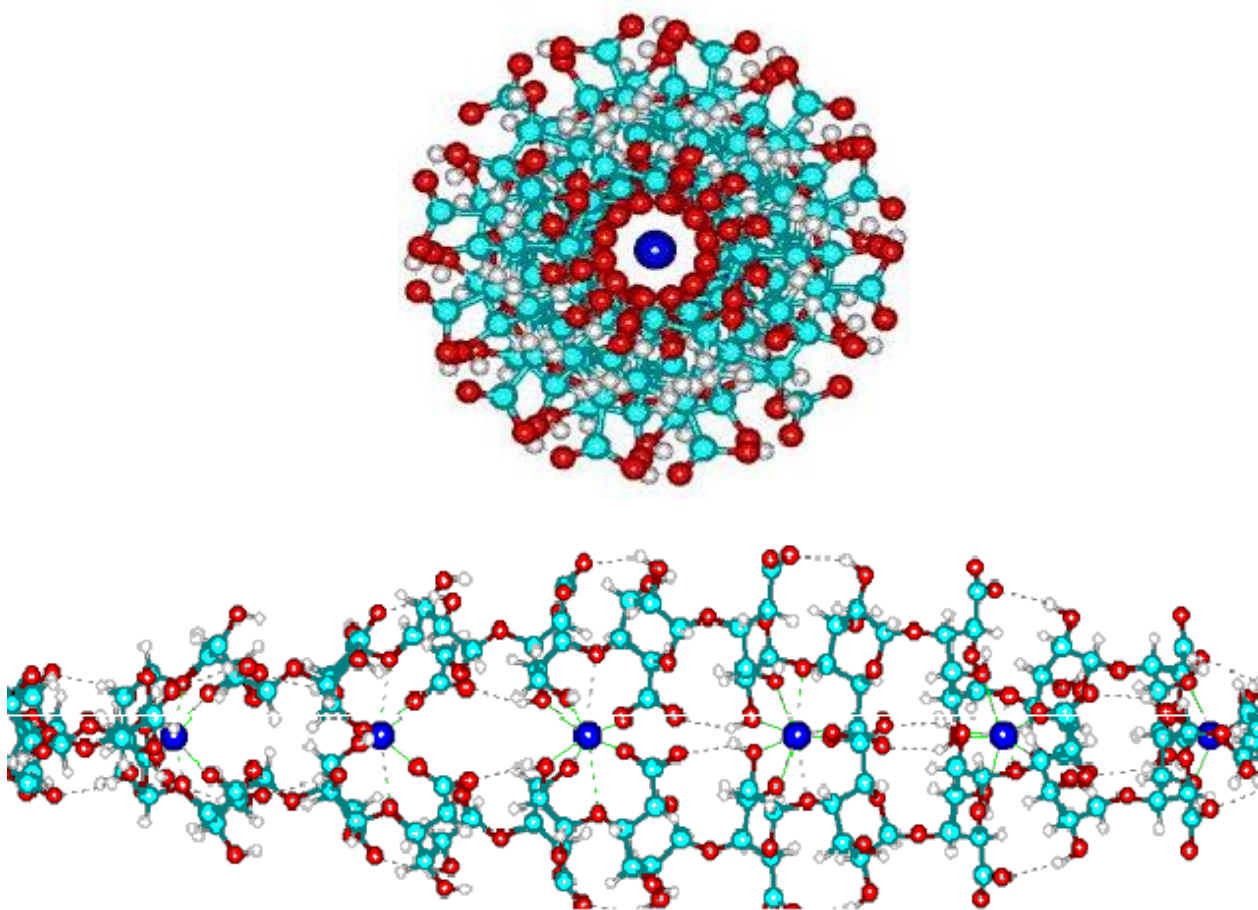


Figura 14 - Estrutura de um alginato de cálcio vista de cima e de lado, respectivamente, onde as esferas maiores e mais escuras representam os átomos de cálcio[14].

A capacidade de formar géis com catiões polivalentes depende da proporção e da distribuição dos monómeros gulurónicos e manurónicos e das ligações intermoleculares dos catiões polivalentes. São estas ligações as responsáveis pela gelificação da solução. A gelificação depende ainda dos iões ligados ($Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$).

Se o alginato for formado por muitos fragmentos G, produzem-se géis fortes e quebradiços, com boa estabilidade ao aquecimento, à excepção dos de baixo peso molecular, mais propensos à água. Os alginatos formados por muitos fragmentos M, são mais fracos, mas mais elásticos e com facilidade em congelar e descongelar [14].

Depois da gelificação, as moléculas de água ligadas à matriz do alginato têm a possibilidade de migrar, o que é muito importante nos géis de alginato quando se aplicam para encapsular ou imobilizar células.

A formação de um gel de cálcio baseia-se num mecanismo de troca iónica. O sódio, ou outro catião de alginato solúvel em água, pode ser trocado pelo cálcio. Pode-se formar um gel de alginato sem “encapsular” o cálcio ou intercalá-lo com outro catião fazendo uma solução ácida de alginato para formar um gel de alginato.

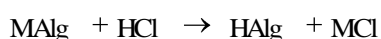
A capacidade do gel para reter a água é devida às forças capilares. A solubilidade do alginato em água e a capacidade de a reter depende do pH (precipitando abaixo de cerca de pH 3,5), do peso molecular (os alginatos de cálcio com menor peso molecular e cadeias com menos de 500 resíduos apresentam aumento de ligações com a água com aumento de tamanho), da força iónica (baixa força iónica aumenta a extensão das cadeias) e da natureza dos iões presentes. Normalmente os alginatos absorvem facilmente a água.

Actualmente, os alginatos estão entre os bpolímeros mais versáteis para uso nas várias indústrias, por exemplo, na indústria alimentar (como espessantes, emulsionantes, estabilizantes, colóides protectores e reguladores da textura), na indústria farmacêutica (como agente fixador e emulsionante nas preparações, como princípio activo dos antiácidos) ou na indústria têxtil (na preparação, como impermeabilizante, e espessante nos estampados). Utiliza-se ainda na pintura, na prótese dentária e outros [17].

4.6.2 - A Produção do Alginato de Sódio

As algas depois de secas, moídas e peneiradas [17], são lixiviadas com ácido clorídrico para facilitar a troca dos cátions presentes, geralmente Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , e Na^{+} , por H^{+} . Deste modo, transformam-se os alginatos da matriz sólida em ácido algínico, insolúvel, o que permite uma recuperação mais eficiente destes alginatos.

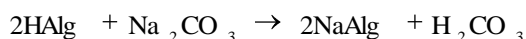
A libertação do ácido algínico traduz-se na seguinte reacção:



Este tratamento, com uma solução de HCl 0,1N demora 2 horas. Depois da lavagem e da filtração das algas, para eliminação dos restos ácidos, separa-se o resíduo sólido submetendo-o a uma maceração. Nesta, o ácido algínico obtido no processo anterior, passa por um tratamento alcalino para solubilizar o extracto como alginato de sódio.

A obtenção do alginato de sódio bruto (impuro), permite a separação do alginato da matriz sólida através de métodos físicos, tais como filtração, centrifugação, decantação, etc, uma vez que o alginato de sódio é solúvel. Utilizam-se agentes fornecedores de sódio tais como Na_2CO_3 , NaOH e NaCl com diferentes concentrações e sujeitos a temperaturas de 20 a 80°C num banho termostático por um período de 0,5 a 3 horas.

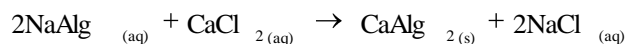
A operação traduz-se pela equação:



Depois de transformado o composto em alginato de sódio, hidratam-se as algas para facilitar a sua migração para a fase aquosa. Como o processo é difusivo, facilita-se usando grandes quantidades de água, aumentando a temperatura e agitando a massa. São necessários 25L de água por Kg de alga seca.

Separando a matriz sólida por centrifugação, fica o alginato de sódio não purificado, juntamente com os elementos que resistiram ao ataque do ácido e da base. O produto assim obtido designou-se por alginato de sódio bruto.

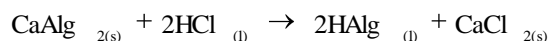
A purificação faz-se por recristalização, ficando os contaminantes no líquido sobrenadante. A posterior recuperação do composto faz-se em melhores condições de pureza. Precipita-se então o alginato, ficando a maior parte dos contaminantes nas algas sobrenadantes, eliminando-se com elas. A precipitação faz-se com cloreto de cálcio a 10% com excesso moderado.



As características do precipitado dependem da velocidade de agitação do meio, do tipo de agregado do reagente, (nem todos os iões de cálcio têm que ligar pares de moléculas, mas podem formar uma rede de alginatos). O sólido obtido, alginato de cálcio, branqueia-se e desodoriza-se por lavagem com NaClO.

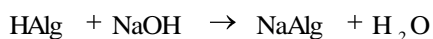
Este alginato de cálcio é o primeiro produto de interesse comercial obtido de forma purificada. A partir deste podem-se obter os restantes.

Para transformar o alginato de cálcio em ácido algínico trata-se com HCl a 5%,



O ácido algínico obtido escorre-se e seca-se na estufa a 50°C e até peso constante, o que permite retirar a água absorvida.

O alginato de sódio consegue-se da solução do ácido algínico por alcalinização com soda cáustica a 5N. Como este alginato é solúvel em água, seca-se na estufa de vácuo a peso constante.



4.7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – Rogers K. R., *Biosensors for Environmental Applications*, Biosensors & Bioelectronics 10 (6-7), **1995**, 533-541
- [2] – Kumar A., *Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application*, JOM-e, 52 (10), **2000**
- [3] – Bruno L., Barra G., Mansur H., Oréface R. L., Polímeros, 14 (3), **2004**, 156-161
- [4] – D’Sousa S. F., Biosensors & Bioelectronics, 16(6), **2001**, 337-353
- [5] – Nice E.C., Catimel B., BioEssays, 21(4), **1999**, 339-352
- [6] - Reneee L. Bunde, Eric J. Jarv, Jeffrey J. Rosentreter, “*Biossensores de Cristais de Quartzo piezoelétricos*”, Talanta 46(6) **1998**, 1223-1236
- [7] - Sekar, C; Balaraman, K *Immobilization of the Fungus, Tolypocladium sp. for the Production of Cyclosporin A*, BIOPROCESS ENGINEERING, 19 (4) **1998**, 281-283
- [8] - Edward, VA; Pillay, VL; Swart, P; Singh, S *Immobilization of xylanase from Thermomyces lanuginosus SSBP using Eudragit S-100*, South African Journal of Science, 98 (11-12), **2002**, 553-554
- [9] - Shah, PA; Aebi, M; Tuor, U, *Method to immobilize the aphid-pathogenic fungus Erynia neoaphidis in an Alginate Matrix for Biocontrol*, Applied and Environmental Microbiology, 64 (11), **1998**, 4260-4263
- [10] - Konstantin A. Lusta, IL Kiung Chung,ILL Whan Sul, Hee Sung Park, Dong ILL Shin, *Immobilization of Fungus Aspergillus sp. by a Novel Cryogel Technique for*

- Production of Extracellular Hydrolytic Enzymes*, Process Biochemistry, 35(10), **2000**, 1177-1182
- [11] - Slokoska L., Angelova M., Pachova S., Petricheva E., Konstantinov C., *Production of Acid Proteinase by Humicola Lutea 120-5 Immobilized in Mixed Photo-cross-linked Polyvinyl Alcohol and Calcium-alginate Beads*, Process Biochemistry, 34(1), **1999**, 73-76
- [12] – D’Annibale A., Stazi S. R., Vinciguerra V., Di Mattia E., x Giovannozzi Sermani E., *Characterization of Immobilized Laccase from Lentinula Edodes and its Use in Olive-mill Wastewater Treatment*, Process Biochemistry, 34(6-7), **1999**, 697-706
- [13] – Rossi-Alva and Rocha-Leão M. H. M., *Astrategic Study Using Mutant-Strain Entrapment in Calcium Alginate for the Production of Saccharomyces cerevisiae Cells with High Invertase Activity*, Biotecnol. Appl. Biochem., 38(1), **2003**., 43-51
- [14] – Chaplin M., *Water Structure and Behavior – Alginate*, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>
- [15] – D. S. Bonnas D. S., *Bioquímica dos Alimentos*, Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia 2003
- [16] - Decreto-Lei n.º 38/2000 de 14 de Março de 14 de Março
- [17] – Alfio A. Z., Rodriguez M. M., Miguel V. U., Errazu A. F., *Produccion de Alginatos Comerciales a Partir de Algas Pardas Patagonicas*, Universidade Nacional da Patagônia San Juan Bosco, Ciudad Universitária, Comodoro Rivadavia, e Plapiqui, Camino de la Carringa K7, Bahía Blanca.
- [18] – Leitão J. H., Barreto C., Richa J. A., Tavares I. M., Nápoles M. M., Lito L., Salgado M. J., Sá-Correia I., *Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia nas infecções crónicas de doentes com Fibrose Quística: tipagem molecular de*

isolados e papel dos exopolissacáridos sintetizados, Boletim de Biotechnologia na Net, nº 60 - Julho 1998

5 – Equipamento e Procedimento Experimental

5.1 – Considerações Gerais

Em todo este trabalho foi utilizado o mesmo equipamento, com ligeiras adaptações segundo a necessidade do trabalho.

No decorrer das experiências dir-se-á de que modo se trabalhou e como se conseguiram os gráficos que vão sendo apresentados ao longo deste trabalho. Porém, neste capítulo far-se-á uma breve referência a todo o material utilizado, ao género de montagens e aos reagentes que se utilizaram, e também ao modo como se tratou todo o material.

5.2 – Lavagem do Material

Todo o material de vidro utilizado foi lavado com uma solução de detergente, passado convenientemente por água destilada e seguidamente passado por álcool ou autoclavado na autoclave Uniclave 88, a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos. Posteriormente era guardado em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar, para evitar possíveis contaminações do fungo.

5.3 – Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

L-metionina (Merck 1.05707), alginato de sódio (Fluka 71238), cloreto de cálcio di-hidratado (Fluka 21097), alginato de cálcio (Fluka 21054), potato dextrose agar, PDA, (Merck 110130), PDA (Fluka 70139), PDA (Difco 514100214010), 4-(maleinidobutyramidometil)-poliestireno (chemica 63178), 2-mercaptoetanol (Fluka 63700), hidróxido de sódio (Merck 31.05.01), ácido bórico (Riedel-de-Haen 31146), cloreto de potássio (Pronolab7447-40-7), fetalaldeído (Sigma-Aldrich 00681), ácido clorídrico (Riedel-de-Haen 30721), metanol (Riedel-de-Haen 32213), ácido 3-

mercaptopropiónico (Fluka 63780), 1-pentanetiol (Fluka 76960), 1-3-propaneditiol (Fluka 81800) e tiofurano (Fluka 06914).

5.4 – Equipamento e Montagens Utilizadas nos Ensaio

As montagens utilizadas nos ensaios com o sensor consistiram essencialmente numa célula com o cristal piezoeléctrico de quartzo e um recipiente de vidro, um oscilador, um frequencímetro e um computador.

O cristal de quartzo era encaixado numa célula de teflon na qual também se encaixava um recipiente de vidro de capacidade aproximada de 20 mL.

Por vezes houve necessidade de trabalhar numa célula termostatzada ligada a um banho termostatzado.

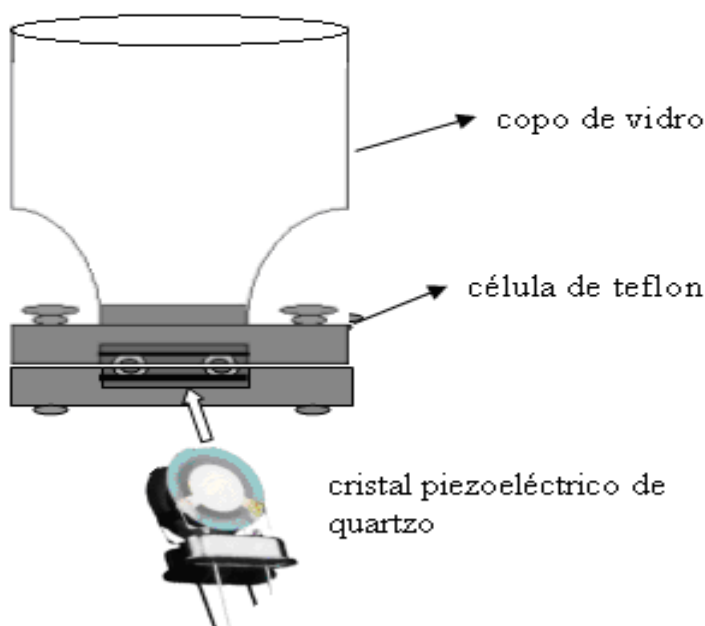


Figura 15 – Célula de teflon onde encaixa o copo de aproximadamente 20 mL e o cristal de quartzo piezoeléctrico

Na figura 15 está representada uma célula de teflon onde encaixa o cristal e o copo de vidro onde se colocaram as soluções

Na figura 16 pode ver-se a célula de teflon, já representada na figura 15, onde está encaixado o cristal piezoelétrico e o recipiente de vidro com célula termostatzada ligada a um banho também termostatzado. Esta célula com circulação de água, proveniente do banho termostatzado, permitiu que a temperatura do líquido a ser estudado se mantivesse constante. O banho é da marca Selecta, sistema de termostatização Frigiterm 6000382.

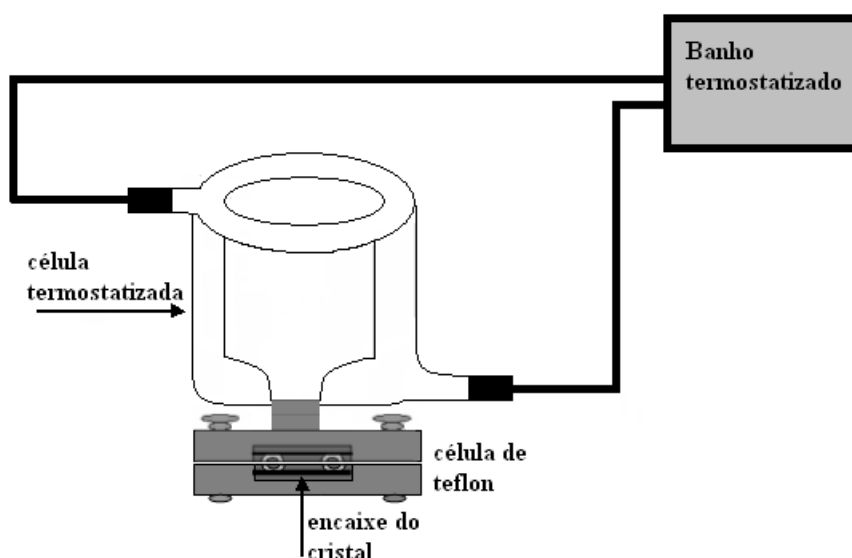


Figura 16 - Imagem da montagem de uma célula termostatzada, ligada a um banho termostatzado

Os cristais (HC6U International Crystal Manufacturing Co., Inc. 031210) que se utilizaram nos ensaios foram de 9 MHz, não polidos com corte AT, com eléctrodo de ouro e com 0,510 cm de diâmetro. Foi sobre estes cristais que se fizeram as várias deposições descritas ao longo deste trabalho. Também foi com estes cristais que se leram as variações de frequência do meio líquido onde se colocou o fungo.

Ao cristal liga-se um oscilador que é responsável por lhe aplicar um campo eléctrico alterno que provoca uma oscilação do cristal piezoeléctrico. Utilizaram-se osciladores da International Crystal Manufacturing Co., Inc., ICM, 35360.

Ao oscilador liga-se um frequencímetro que lê a frequência de oscilação do cristal. Os frequencímetros utilizados foram da marca Philips PM6680 e Leader LF827, ligados por um cabo GPIB a um computador através de uma porta GPIB ISA-EISA 82341-D (W95). Os dados foram obtidos em intervalos variáveis conforme o ensaio de que provinham.

Além do banho termostatzado também foi utilizada uma estufa à temperatura de 28°C.

Como se pode ver pela figura 17 aos cristais das células estavam ligados os respectivos osciladores, fontes de alimentação e frequencímetros que por sua vez se ligavam ao computador onde eram registados os dados debitados pelos frequencímetros.

Sempre que era necessário fazer adições da solução a estudar, introduzia-se na estufa uma micropipeta para esse fim, como mostra a figura.

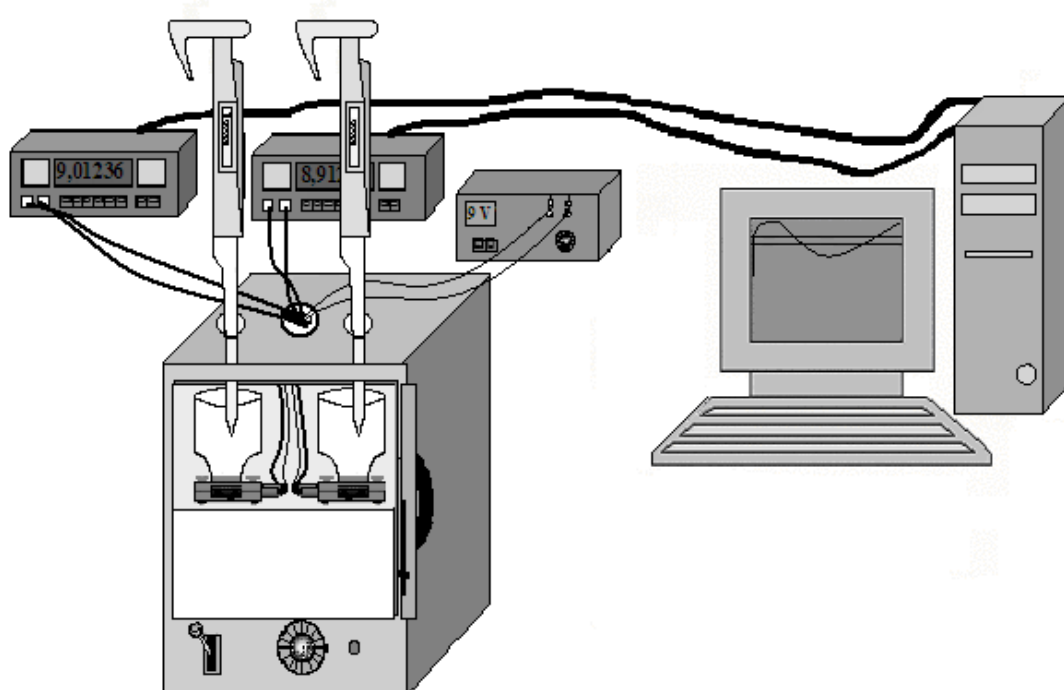


Figura 17 - Montagem das células dentro de uma estufa, ligadas aos respectivos osciladores, frequencímetros e computador em que se podia fazer a adição de solução a ser estudada pela introdução de uma micropipeta.

As determinações de L-Metionina foram feitas no Espectrofotómetro de UV/Vis, marca Shimadzu, Modelo UV-2101PC

5.5 – Procedimento Experimental

5.5.1 – Deposições do Fungo nos Cristais

Sempre que se fizeram deposições do fungo nos cristais, cobriu-se apenas o eléctrodo de uma das faces, que depois se colocava em contacto com a solução a ensaiar.

Ao colocar-se o cristal, na célula, em contacto com a solução ou meio onde crescia o fungo, apenas a face do cristal com a deposição ficava em contacto com a solução, tendo sempre a face oposta em contacto com o ar.

5.5.2 – Cultura do Fungo Sporothrix

Como já foi referido por Lepidi, Nuti e Filippi, [1] este microorganismo, tem fraco crescimento num meio isento de compostos que não contenham o grupo -S-C-. Assim, para os objectivos deste estudo encomendou-se o microorganismo descrito no artigo referido, o fungo inflata de Hoog, da colecção ATCC [2]. Da espécie pura fez-se a cultura no meio indicado, PDA, (agar de dextrose de batata) e manteve-se por 7 dias a 28°C.

Inicialmente a cultura fez-se em meio sólido, PDA (Merck, 110130), ficando com o aspecto que lhe é característico como se mostra mais adiante. Contudo, ao encomendar-se mais meio de outras marcas houve problemas com a cultura do fungo como se referirá no capítulo 6, tendo-se obtido uma cultura escura. Isto obrigou a que se variassem todas as condições em que se fez a primeira cultura até conseguir uma semelhante à primeira.

5.5.3 – Comparação do Fungo *Sporothrix* com o Existente em Águas Sulfúreas do Distrito de Bragança

Uma vez que a nutrição deste microorganismo está associada à existência de enxofre, supôs-se que também se encontrasse nas fontes de água sulfúrea. Tinha sido feito o levantamento das fontes existentes sulfúreas existentes no Distrito de Bragança, uma vez que se pretendia estudar as suas águas. Assim, e para confirmar se este microorganismo, o fungo *Sporothrix* que se alimenta de enxofre, vive nos locais onde este existe, fez-se uma colheita dos limos de uma destas fontes. A colheita fez-se no tanque das termas de São Lourenço, em Pombal de Ansiães, Carrazeda de Ansiães, uma água sulfúrea sódica mesotermal [3]. Os limos colhidos foram semeados em meio PDA, (Merck, 110130) e mantidos por 7 dias numa estufa a 28°C.

Desta cultura, que é uma mistura de culturas, foram isoladas as diferentes espécies. Com estas espécies fizeram-se novas culturas, cada uma numa placa diferente, todas contendo o mesmo meio, PDA (Merck, 110130), uma vez que todas as espécies que a cultura mostra se deram neste meio. As placas ficaram na estufa a 28°C durante pelo menos 7 dias.

Destas culturas já isoladas, tendo cada espécie numa placa, fez-se uma preparação de cada uma das placas para ser observada e confirmada através do exame microscópico.

5.5.4 – Determinação da L-metionina por Espectrofotometria de UV/Vis

Como já se referiu, Lepidi, Nuti e Filippi [1] verificaram que o fungo *Sporothrix* tinha um bom crescimento nos meios com enxofre orgânico, nomeadamente com aminoácidos. Este artigo indica que o maior crescimento do fungo se verifica num meio que contenha L-metionina.

A determinação da L-metionina que restava depois da cultura dos fungos era determinada por espectrofotometria de UV/Vis [4].

Este método baseia-se na reacção dos aminoácidos com o o-ftaldialdeído na presença de espécies que contêm o grupo –SH. Por causa da instabilidade dos isoindóis obtidos a partir dos aminoácidos e da adição de o-ftaldialdeído/2-mercaptoetanol, usou-se a solução o-ftaldialdeído/ácido 3-mercaptopropiónico.

As reacções de derivatização foram conduzidas em solução tampão de borato pH 9,4.

5.5.5 – Comportamento do Fungo com a L-metionina.

Por via dos trabalhos feitos por Lepidi, Nuti e Filippi [1] fizeram-se culturas líquidas do fungo em soluções com diferentes concentrações de L-metionina.

Em Erlenmeyers colocaram-se 15 mL de soluções com 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L de L-metionina. Noutros ensaios idênticos as concentrações da L-metionina foram de 10,74, 21,42 e 32,28 mg/L.

Em cada Erlenmeyer colocou-se um pedacinho do fungo cortado de uma cultura, tentando que estes pedaços de fungo fossem o mais iguais possível.

Estas culturas líquidas foram mantidas na estufa a 28°C

De cada um dos Erlenmeyers e no período de um dia era determinada, como já se disse, por espectrofotometria do UV/Vis a 334 nm, a L-metionina [4] que não tinha sido consumida pelo fungo.

5.5.6 – Imobilização do Fungo *Sporothrix* sobre o Cristal Piezoelectrico

Não existindo estudos com os cristais piezoelectricos recorreu-se a outros trabalhos em que a imobilização foi obtida com a polimerização do alginato de sódio.

Assim, começou-se por seguir a técnica de fazer uma solução de alginato de sódio e de micélio sensivelmente 1:1. Utilizou-se uma solução de alginato de sódio a 2% (p/p) envolvendo-se nele o micélio finamente dividido. Gotejava-se esta solução numa outra de cloreto de cálcio 0,25 M formando assim contas onde o fungo ficava imobilizado pela polimerização do alginato de sódio com o cloreto de cálcio. Após a polimerização as contas eram lavadas em água esterilizada para retirar o cloreto de cálcio excedente.

Não se tendo conseguido resultado satisfatório com o fungo assim imobilizado pensou-se que, com estas concentrações, o polímero ficasse pouco poroso impedindo o crescimento do microorganismo. Repetiram-se as operações fazendo variar as concentrações quer do alginato, quer do cloreto de cálcio, tendo-se ajustado o pH do alginato a 7 com tampão fosfato.

Para haver certeza de que o fungo estava vivo e crescia, fez-se a cultura das contas, como se mostra no capítulo 6, com a imobilização feita em duas condições diferentes: alginato de sódio a 2% e CaCl_2 0,25 M sem acerto de pH e alginato de sódio a 1% a pH 7 (diluindo-o mais a adição do tampão) e CaCl_2 0,125 M.

Uma vez que esta imobilização não adería na superfície do cristal fez-se uma solução de alginato de sódio e de micélio que se colocava sobre o eléctrodo e se cobria com uma gota de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,125 M. O Cloreto de cálcio excedente era lavado com uma gota de água.

Ainda assim, não se obtiveram bons resultados com esta imobilização, pelo que se passou a fazer a cultura do fungo directamente sobre o cristal. Para isso colocava-se uma gota de alginato de sódio sobre o eléctrodo na qual se depositava um quadradinho de fungo como se se tratasse de uma cultura. Para polimerizar, o alginato era recoberto com uma gota de cloreto de cálcio.

5.5.7 – Determinação da L-metionina Utilizando uma MCPQ e o Fungo *Sporothrix*

Como a cultura do fungo num meio líquido de metionina se mostrou eficaz, decidiu-se determinar este aminoácido com uma microbalança de cristais piezoeléctricos de quartzo e o fungo *Sporothrix*.

Assim, colocou-se numa célula a metionina com o fungo e as variações da solução eram medidas pela variação de frequência de um cristal piezoelétrico de quartzo.

Em cada ensaio variava-se a concentração de metionina na célula e estudava-se o consumo desta pelo fungo ao longo do tempo, através da variação de frequência do cristal em contacto com a solução.

5.5.8 – Estudo da Resposta da MCPQ e do fungo *Sporothrix* à adição de L-metionina

Para testar a resposta do sensor ao enxofre orgânico, utilizou-se a montagem que foi descrita na figura 17. Na célula foram colocados água esterilizada e o fungo *Sporothrix*.

Após um período de estabilização, foram adicionados com o auxílio de uma micropipeta, 60 μL de uma solução de L-metionina, correspondentes a 0,3 mg/L de enxofre orgânico e esperou-se pela variação de frequência do cristal. Depois desta resposta continuou a adicionar-se metionina a fim de avaliar a resposta do cristal e da solução com o fungo ao crescente aumento de metionina.

5.5.9 – Resposta da MCPQ só com água à adição de L-metionina

A fim de comparar as respostas das adições da L-metionina ao sensor (MCPQ e fungo *Sporothrix*) ao enxofre orgânico, utilizou-se também a MCPQ só com água, á qual se adicionou a mesma quantidade de metionina, 60 μL correspondentes a 0,3 mg/L deste aminoácido.

5.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – “ *A particular thio-ether group requiring microfungus and its utilization for the detection of organic sulphur compounds in soil, water and atmosphere*”, A.A. Lepidi, M. P. Nuti, C. Filippi, Instituto de Microbiologia Agrária e Técnica dell’Università di Pisa Centro de Studio per la Microbiologia del Suolo del C.N.R.- Pisa, Ann. Micr.23.75 (**1973**)
- [2] – “Fungi, Yeast, andYeast Genetic Stock”,
<http://www.atcc.org/Search/Catalogs/longview.ctm?view=ly,4492364,24605&text=24605>
- [3] – D’Almeida, Dr. Amaro e Almeida, João D. de, “*Inventário Hidrológico de Portugal – Trás-os-Montes*”, Instituto de Hidrologia de Lisboa, 2ª edição, **1970**
- [4] - IBOLYA, Molnar-Perl, IMRE Bozor, “*Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristicsof the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives*” Journal of Chromatografy A., 798(1-2), **1998**, 37-46

6 – Resultados e Discussão

6.1 – A Cultura do Fungo

A cultura fez-se, inicialmente, em meio sólido, PDA (Merck, 110130) apresentando o aspecto representado na figura 17 (a). Havendo necessidade de adquirir mais reagente PDA, este foi fornecido por outra firma (Fluka, 70139), e não se conseguiu outra cultura semelhante à primeira. As culturas obtidas com este meio tinham um aspecto escuro como mostra a fotografia da placa da figura 18 (b). Sendo um fungo novo, em crescimento, a cor não poderia ser atribuída a conídias escuras vindas directamente das hifas [51]. Pretendia-se obter culturas semelhantes à primeira. Variaram-se, uma a uma, as diferentes condições exigidas pela cultura sem que se conseguissem culturas consideradas saudáveis. Por fim utilizou-se PDA de outra marca, (Difco, 213400) obtendo-se sempre a cultura escura, que indica tratar-se de uma cultura velha, por esta ter grande produção de conídias castanhas.

Este problema só foi resolvido depois de repetir uma das primeiras condições, a utilização do produto PDA (Merck, 110130), obtendo-se a cultura que se esperava a da figura 18 (a).



(a)



(b)

Figura 18 – Aspecto da cultura pura do fungo adquirido (a) e aspecto da mesma cultura num meio que lhe não é favorável (b)

Da cultura pura fez-se uma preparação com a finalidade de ver, microscópicamente o aspecto do fungo com que se iria trabalhar. Essa preparação tinha vários aspectos conforme o espaço captado pelo microscópio. Destes aspectos mostram-se quatro que parecem ser os mais elucidativos.

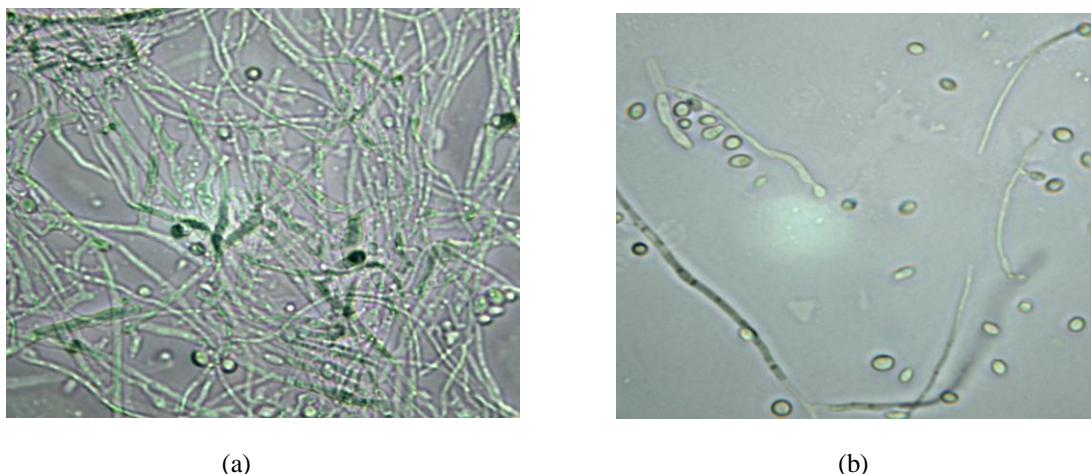


Figura 19 – Aspecto de uma preparação da cultura pura do fungo adquirido (a). Outro aspecto da mesma preparação (b). Ampliação 400x.

Na figura 19 podem ver-se dois aspectos diferentes, (a) e (b), que são imagens colhidas em lugares diferentes da mesma preparação, feita de um pedacinho da cultura pura e com uma ampliação de 400x.

A figura 20 (a) e (b) mostra mais dois aspectos, muito diferentes dos anteriores e focados da mesma preparação feita da mesma cultura e obtida com a mesma ampliação, 400x. Na primeira, figura 20 (a), vê-se uma grande concentração de esporos. Estes, depois de deixaram as hifas e devido à humidade da preparação, foram empurrados para um dos lados da mesma. Na figura 20 (b), um aspecto semelhante, da mesma cultura, com as células em navete como se se tratasse de uma levedura.

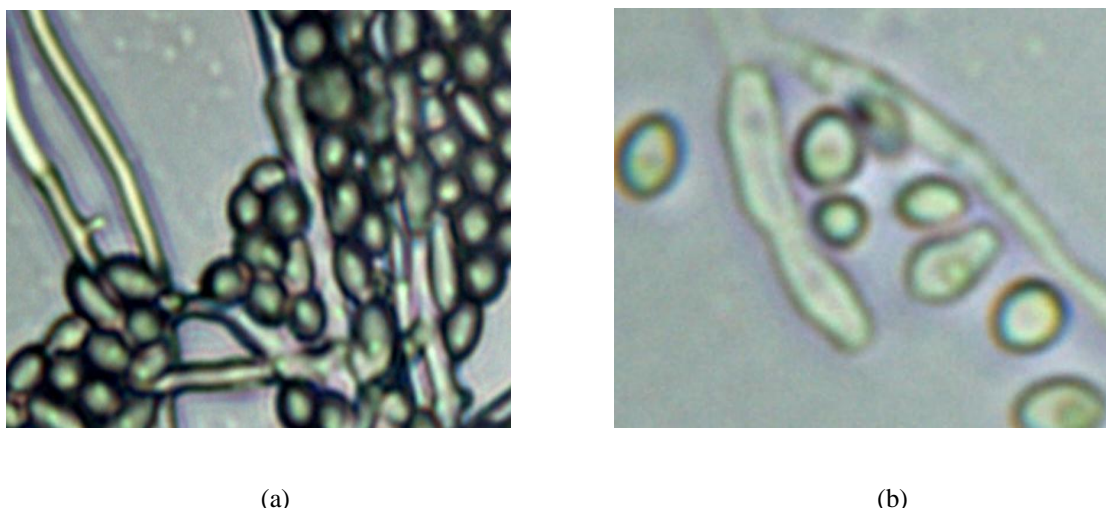


Figura 20 – Da mesma preparação, outro aspecto da cultura pura do fungo adquirido com grande concentração de esporos(a) e aspecto da mesma cultura pura com esporos em navete (b). Ampliação 400x

Com o trabalho desenvolvido até aqui, ficou assim a conhecer-se o aspecto, algumas características e também algumas exigências deste microorganismo, o fungo *Sporothrix*. O aspecto já tinha sido descrito por Lepidi, Nuti e Filippi, [1]

6.1.1 – Comparação do Fungo *Sporothrix* com o Existente nas Águas Sulfúreas do Distrito de Bragança

Uma vez que a nutrição deste microorganismo está associada à existência de enxofre, supôs-se que também se encontrasse nas fontes de água sulfúrea. Como o objectivo último deste estudo era a caracterização das águas sulfúreas do distrito de Bragança, tinha sido feito o levantamento das fontes existentes. Assim, e para confirmar que este microorganismo, o fungo *Sporothrix* que se alimenta de enxofre, vive em todas os locais onde este existe, fez-se uma cultura dos limos de uma destas fontes. A colheita, como já se disse fez-se no tanque das termas de São Lourenço, em Pombal de Ansiães,

Carrazeda de Ansiães, uma água sulfúrea sódica mesotermal [3]. Colheram-se limos que foram semeados em meio PDA, (Merck, 110130) e mantidos por 7 dias numa estufa a 28°C.

O resultado foi a obtenção de uma cultura mista, com algumas espécies de microorganismos, como seria de esperar num meio complexo como os limos de uma fonte e como se pode ver na figura 21.

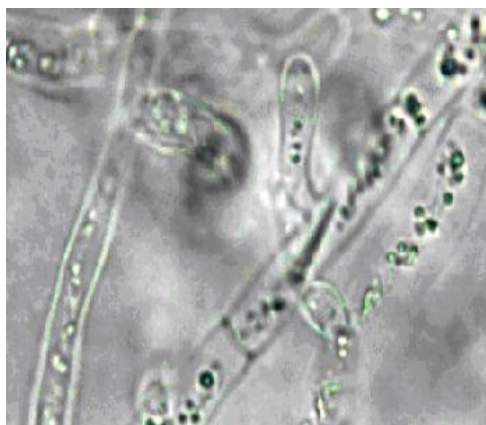


Figura 21 – Cultura resultante da colheita dos limos das termas de São Lourenço, de onde se isolaram diversos microorganismos

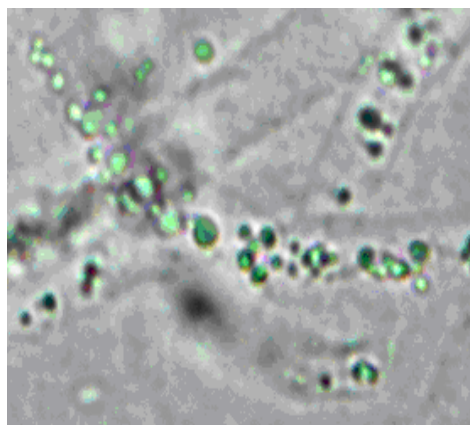
Desta cultura, que é uma mistura de culturas, foram isoladas as diferentes espécies. Com estas espécies fizeram-se novas culturas, cada uma numa placa diferente, todas contendo o mesmo meio, PDA (Merck, 110130), uma vez que todas as espécies que a cultura mostra se deram neste meio. As placas ficaram na estufa a 28°C durante pelo menos 7 dias.

Destas culturas já isoladas, tendo cada espécie numa placa, fez-se uma preparação de cada uma das placas para ser observada e confirmada através do exame microscópico.

Das culturas feitas e das observações referidas identificaram-se o fungo *Sporothrix*, a penicilina, leveduras e bactérias. As imagens seguintes são um exemplo dos microorganismos encontrados na cultura dos limos da fonte sulfúrea.



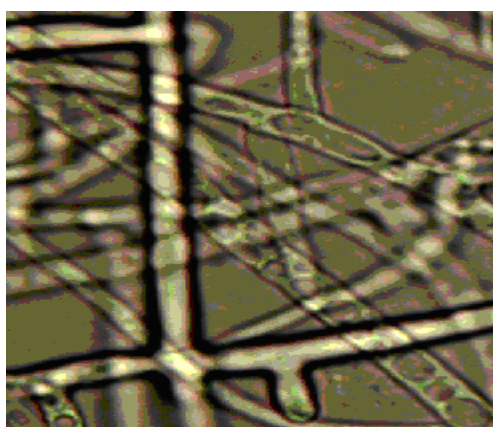
(a)



(b)

Figura 22 – Dois aspectos diferentes da mesma preparação feita da placa que tinha a cultura do fungo *Sporothrix*. Em (a) vêem-se as hifas contendo os esporos e em (b) são mais visíveis os esporos. Ampliação 400x

Na figura 22 (a) acima, observam-se algumas hifas do fungo *Sporothrix* com esporos que começam a ser libertados como já se vê na imagem da direita, (b) com as hifas mais esbatidas.



(a)

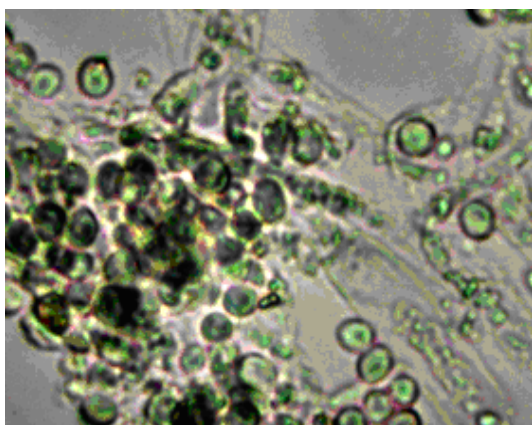


(b)

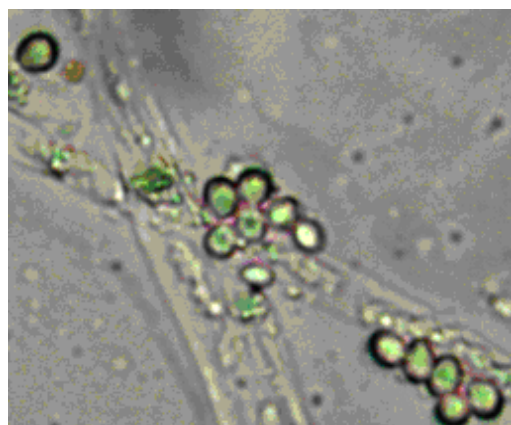
Figura 23 – Da mesma preparação, a anterior, dois aspectos da cultura do fungo *Sporothrix* isolado da cultura dos limos com grandes hifas muito visíveis (a) e aspecto da mesma cultura com hifas noutra posição (b). Ampliação 400x

As figuras 22 e 23 mostram quatro aspectos diferentes, focados em posições diferentes de uma mesma preparação obtida da cultura que se isolou a partir da que foi feita dos limos e que mostra o fungo *Sporothrix*.

Como estas figuras provêm da placa onde se tinha isolado o fungo *Sporothrix*, elas confirmam a hipótese que se tinha colocado de que, uma vez que o fungo *Sporothrix* se alimenta de enxofre, deveria viver também nos limos ou noutros locais de uma fonte sulfúrea. Conclui-se assim que as condições fornecidas por uma fonte sulfúrea são ideais para a vida deste microorganismo.



(a)



(b)

Figura 24 – Esta preparação mostra a existência de penicilina numa preparação feita da cultura isolada da cultura dos limos. Maior concentração de penicilina (a) e menor concentração da penicilina (b). Ampliação 400x

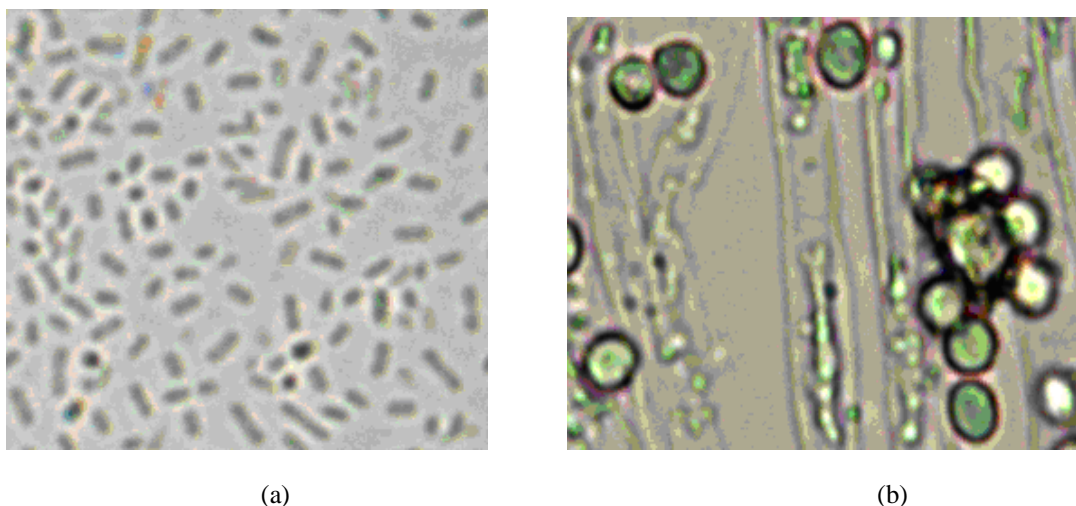


Figura 25 – Imagem de duas preparações referentes a duas culturas que se isolaram da cultura feita com os limos. Bactérias(a) e leveduras (b). Ampliação 400x

Na figura 24 quer em (a), quer em (b), vêem-se dois aspectos diferentes da penicilina que existe na água da fonte sulfúrea onde se fez a colheita. Pode ser também a existência desta penicilina que confere a estas águas grande parte propriedades curativas que as populações lhes atribuem.

Na figura 25 (a) podem ver-se as bactérias da preparação feita da cultura dos limos e na figura 25 (b) as leveduras existentes na mesma água.

Este trabalho, realizado com a colheita dos limos da água sulfúrea das termas de São Lourenço em Pombal de Ansiães, e as imagens apresentadas permitem concluir que uma água sulfúrea se podem encontrar o fungo *Sporothrix*, a penicilina, bactérias e leveduras.

6.2 – Evidência Experimental da Metabolização do Enxofre pelo Fungo

Como se disse no capítulo 5 fizeram-se culturas líquidas em que se colocava um pedaço do fungo num balão com L-metionina de várias concentrações. O meio consistia em 15 mL de solução da L-metionina de concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg S/L e

noutra série de 10,74, 21,41 e 32,28 mg S/L. Diariamente fizeram-se medições da metionina que restava nos balões por UV/Vis.

O gráfico 1 representa uma das calibrações diárias que se faziam para estudar a variação da concentração da L-metionina do meio em que estava o fungo *Sporothrix*.

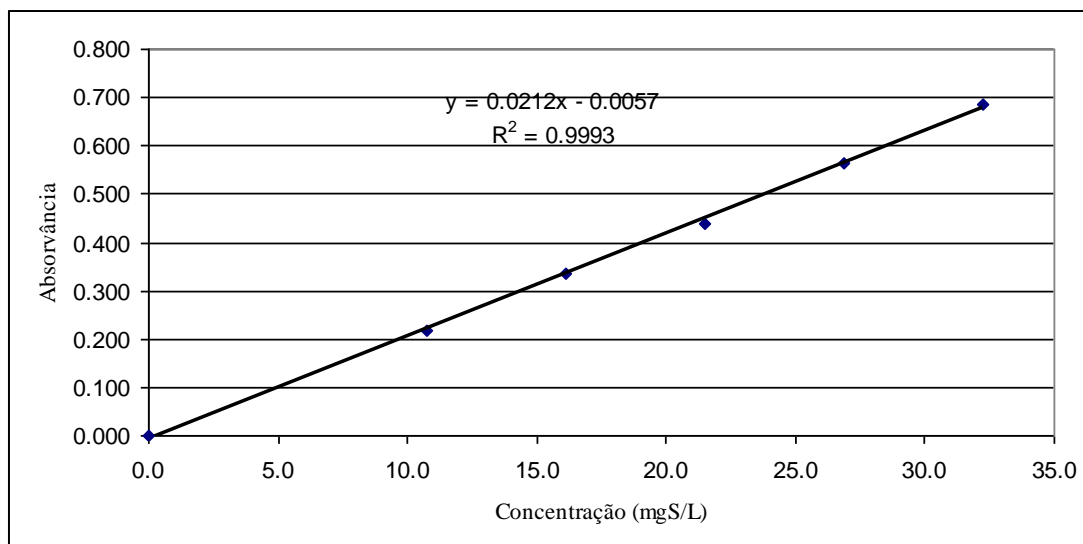


Gráfico 1 – Recta de calibração de uma das determinações da L-metionina que restava da cultura do fungo *Sporothrix* em meio líquido.

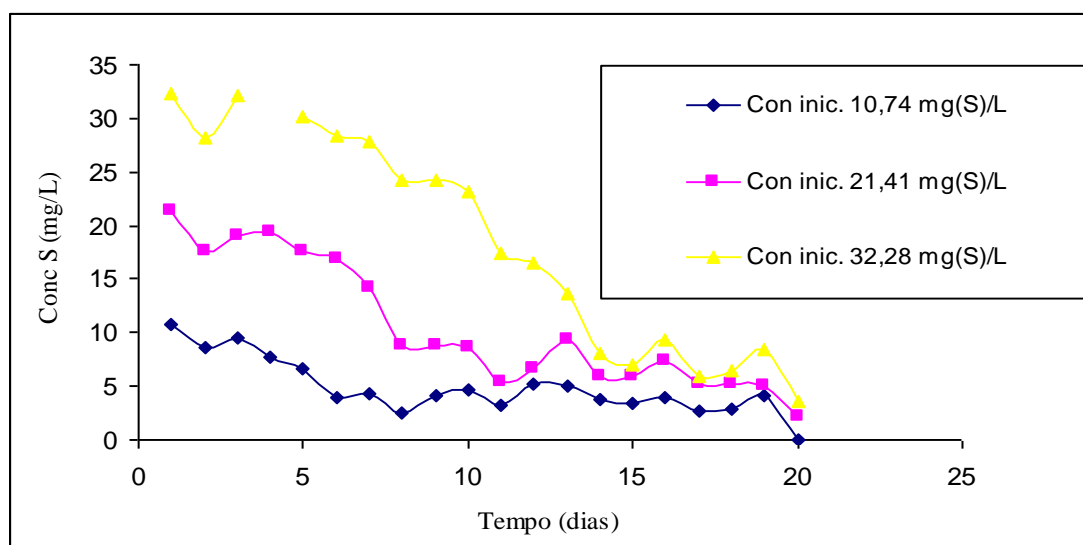


Gráfico 2 – Variação da concentração da L-metionina da cultura líquida ao longo do tempo

O gráfico 2 mostra a variação das concentrações da L-metionina nas culturas de 10,74, 21,41 e 32,28 mg S/L com o tempo.

Este resultado permite concluir que a metionina foi consumida pelo fungo.

O fungo foi capaz de metabolizar a metionina de soluções até 32,28 mg S/L em vinte dias

Posteriormente, e para ter a certeza de que o fungo tinha crescido neste meio, L-metionina, ou, pelo menos que estava vivo, fez-se uma cultura numa placa em meio PDA sólido. Como se esperava e como o mostra a figura 26, o fungo cresceu normalmente, o que nos indicou que durante a duração da experiência, o fungo foi alimentado por este aminoácido.

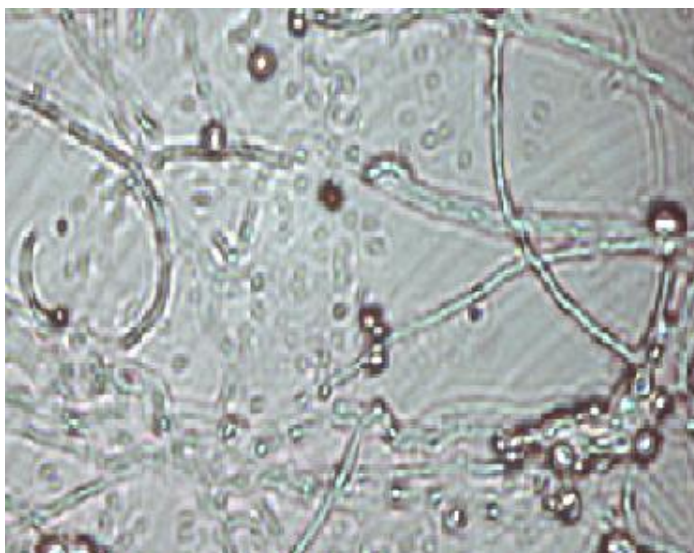


Figura 26 - Imagem da preparação da cultura do fungo feita depois de ter crescido na L-metionina

Concluiu-se que a solução de L-metionina era indicada para este trabalho e para estudar o funcionamento do biossensor do cristal piezoelétrico com uma imobilização do fungo *Sporothrix*.

6.3 – Imobilização da Mistura do Micélio e do Fungo com Alginato de Sódio, Polimerizado com Cloreto de Cálcio, sobre o Eléctrodo

No sentido de obter uma imobilização mais eficiente, optou-se por proceder primeiramente à deposição do alginato e fungo sobre o eléctrodo e posteriormente à respectiva polimerização.

Colocavam-se as gotas de micélio e de alginato de sódio a 1% sobre a superfície do eléctrodo e recobria-se com uma gota de cloreto de cálcio a 0,125 M. Com a conta de alginato assim feita a deposição no eléctrodo tinha uma variação de frequência de 5522 Hz. Seguidamente era introduzido na célula de suporte, adicionada solução da L-metionina com 10 mg/L e o conjunto colocado na estufa a 28 °C. Com esta imobilização a frequência começava por atingir um valor mais ou menos constante a partir de cerca dos 90 minutos conforme se evidencia no gráfico 3.

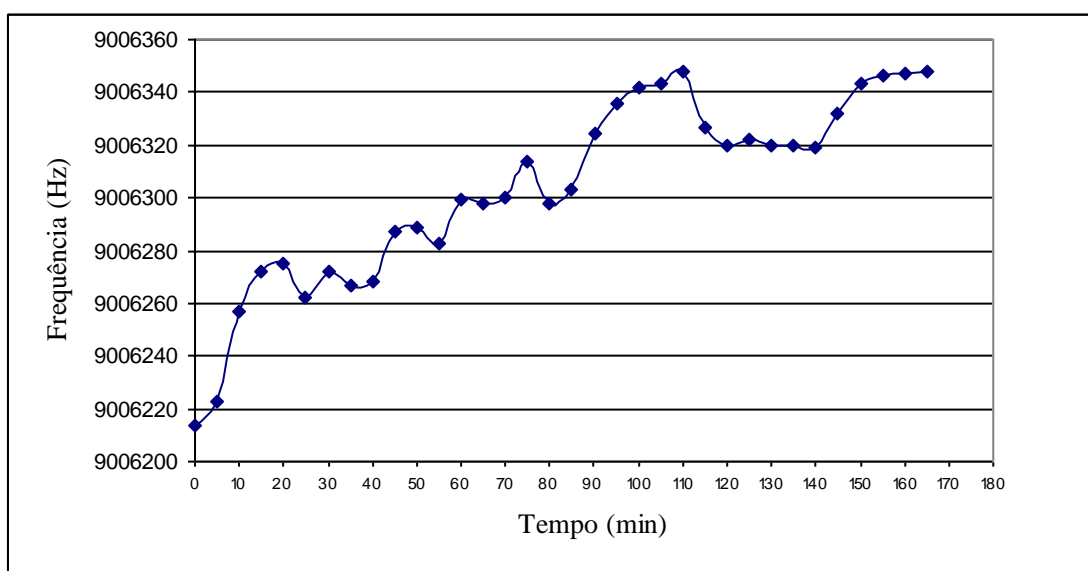


Gráfico 3 – Variação da frequência com a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina 10 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

Simultaneamente o cristal com uma imobilização semelhante foi colocado numa célula termostatzada a 28 °C. Aqui a variação da frequência causada pela imobilização foi de 6485 Hz, tendo-se também observado, com excepção da fase inicial um valor mais ou menos constante como se pode ver no gráfico 4.

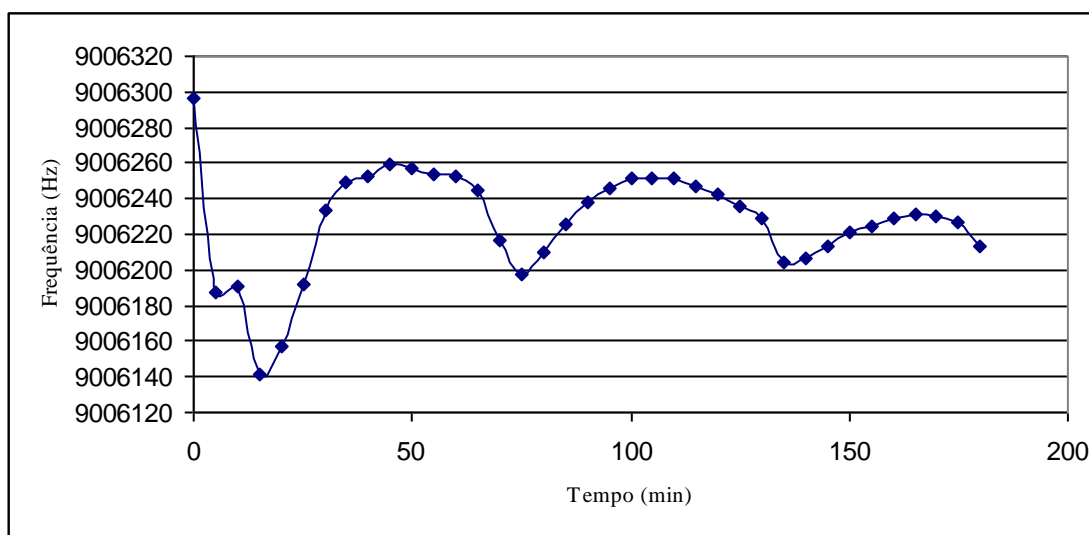


Gráfico 4 – Variação da frequência com a a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução de 10 mg S/L de L-metionina e numa célula termostatzada a 28°C

Pensou-se que a subida de frequência, gráfico 3, seria por falta de alimentação do fungo visto este não parecer aumentar a massa sobre o eléctrodo. Como este cresce no meio PDA experimentou-se colocar o cristal com a imobilização numa solução de L-metionina a várias concentrações a que se juntava o meio PDA líquido. A variação da frequência causada pela imobilização, neste caso, foi de 7518 Hz. O fungo fica imobilizado pois a frequência diminui antes da adição das soluções. Com excepção das oscilações a frequência permanece mais ou menos constante, gráfico 4

Conclui-se que esta imobilização é estável mas que o fungo ocluído não cresce.

O gráfico 5 mostra a variação de um destes sistemas, com PDA e a L-metionina com 10 mg S/L na estufa a 28°C. Neste caso o fungo também ficou imobilizado pois a frequência diminuiu antes da adição das soluções.

Neste caso a frequência atinge um valor mais ou menos estável.

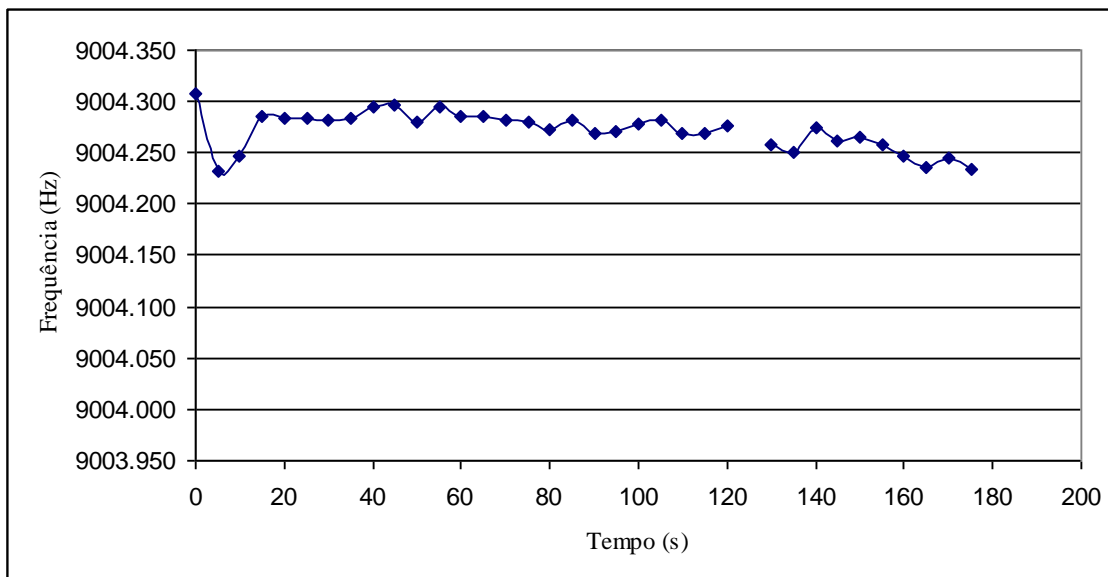


Gráfico 5– Variação da frequência com a deposição da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio, sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 10 mg S/L de L-metionina e com a célula na estufa a 28°C

Simultâneamente, o sistema era colocado numa célula termostaticada a 28°C. Um dos resultados está expresso no gráfico 6 com o meio PDA líquido e a L-metionona com 10 mg S/L.

Com esta solução, L-metionina e agar de dextrose de batata, PDA, e com esta imobilização, a frequência parece também atingir um valor mais ou menos constante, pelo que se pode concluir que não é a falta do meio que impede o fungo de crescer ou de metabolizar os alimentos. Sopunha-se que esta situação levasse a uma diminuição da frequência.

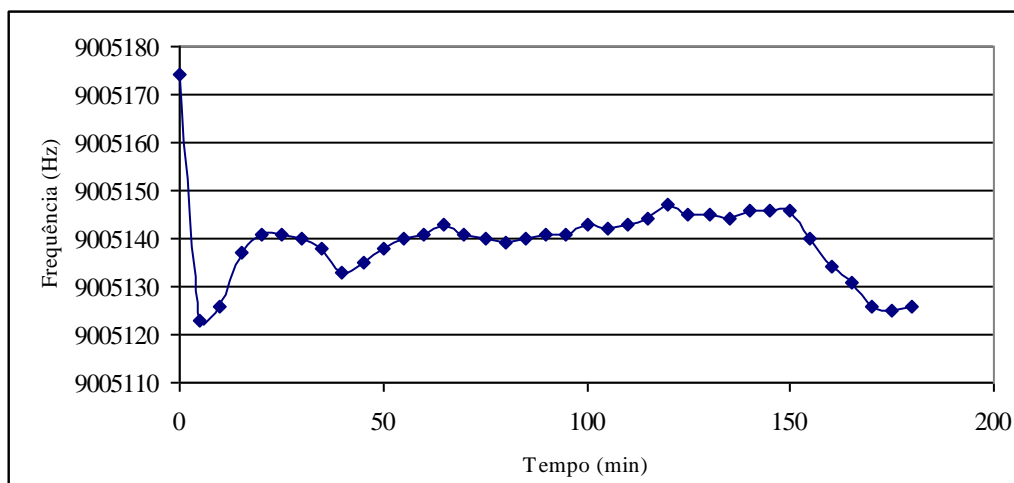


Gráfico 6– Variação da frequência com a deposição da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 10 mg S/L de L-metionina e com célula termostaticada a 28°C.

Os dados do gráfico 7 foram obtidos com uma concentração de L-metionina dez vezes superior, 100 mg S/L, para estudar a reacção do fungo a uma maior concentração e com o sistema colocado na estufa a 28°C. Neste caso a variação da frequência causada pela deposição foi de 5673 HZ

Também estes resultados não foram conclusivos embora a frequência pareça mais ou menos constante apesar das oscilações.

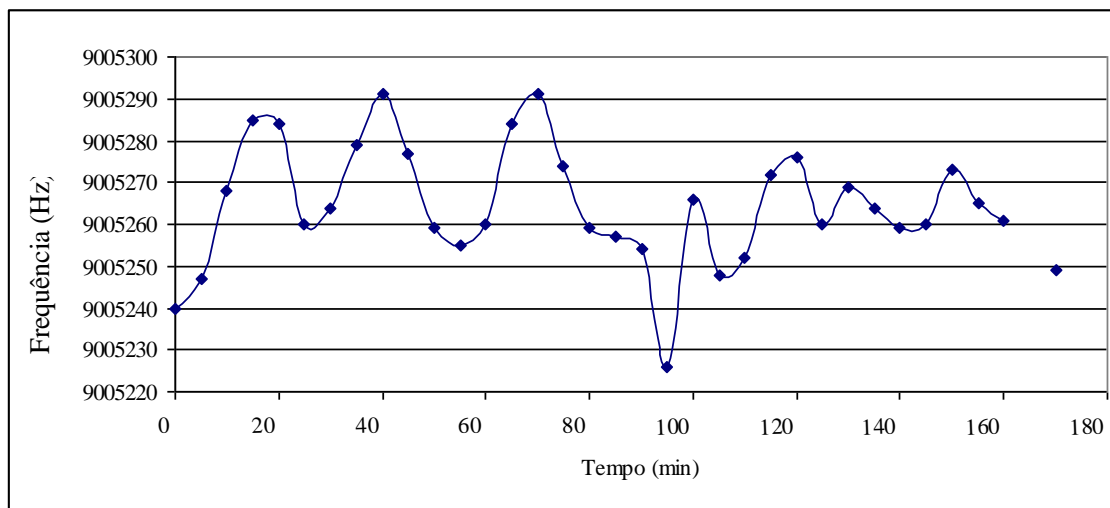


Gráfico 7– Variação da frequência da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 100 mg S/L de L-metionina e com a célula na estufa a 28°C

O gráfico 8 apresenta o mesmo ensaio mas com a célula num banho termostaticado.

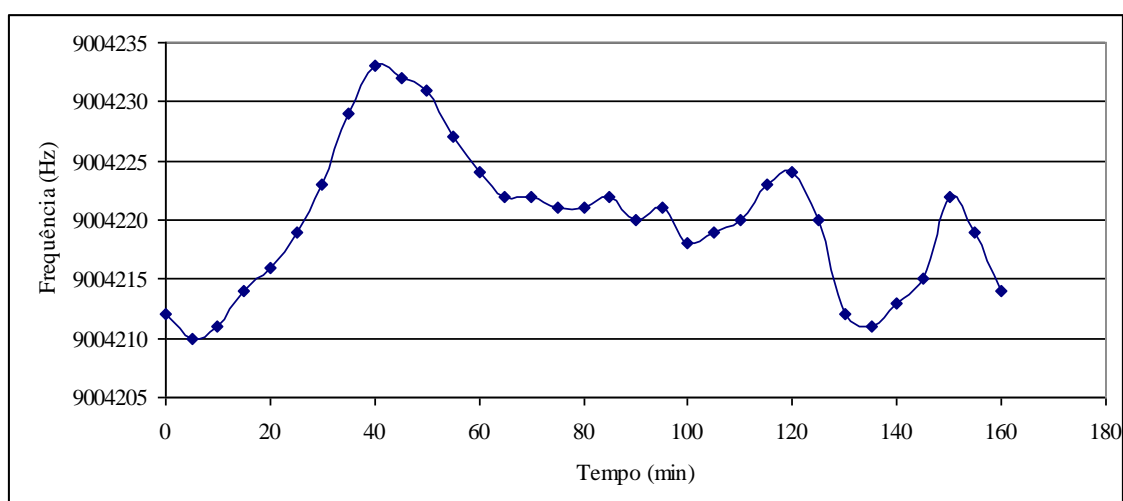


Gráfico 8– Variação da frequência com a imobilização da mistura do fungo e do alginato polimerizado com cloreto de cálcio sobre o eléctrodo, numa solução do meio PDA líquido e 100 mg S/L de L-metionina e com a célula termostaticada a 28°C

No gráfico 8, a frequência pareceu ter alguma tendência a descer, mas não se verificou qualquer estabilização na mesma.

Conclui-se que esta imobilização é estável mas que o fungo ocluído não cresce.

6.4 – Imobilização da Cultura do Fungo Directamente sobre o Eléctrodo

Uma vez que com a imobilização anterior não se obtiveram resultados consistentes, optou-se por alterar o processo de imobilização.

Desta vez fez-se a cultura do fungo directamente sobre o cristal, ou seja, colocou-se uma gota de alginato no eléctrodo sobre o qual se punha uma pequena porção de fungo em forma de quadrado com 3 mm de lado aproximadamente. Seguidamente adicionava-se cloreto de cálcio ao alginato ficando o fungo como se estivesse numa cultura. O cristal com o fungo imobilizado era colocado na respectiva célula, adicionada solução de L-metionina de concentrações variadas e o conjunto posto numa estufa à temperatura de 28°C

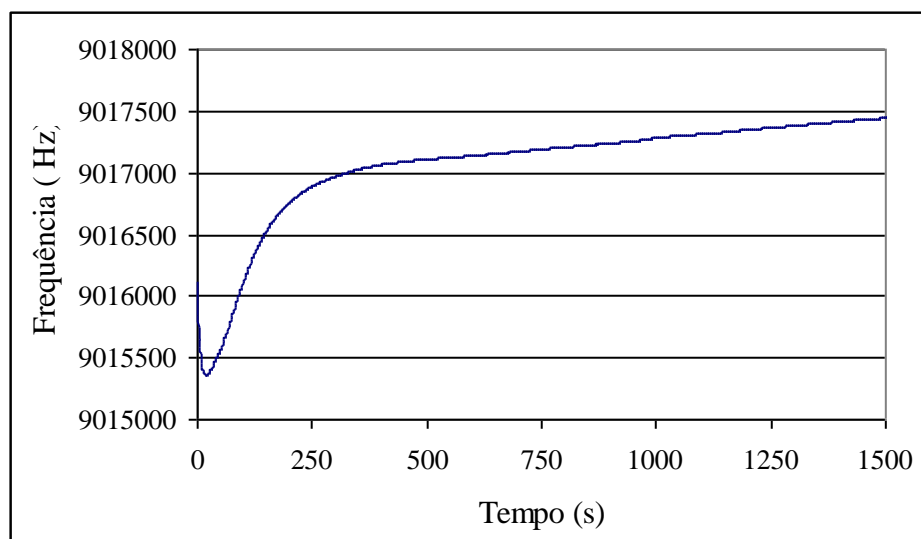


Gráfico 9 – Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina com 10 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

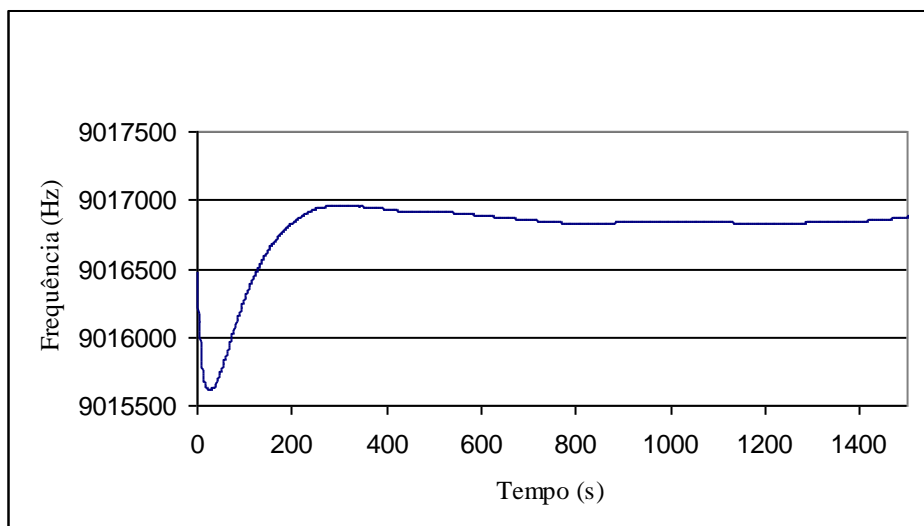


Gráfico 10– Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução de L-metionina com 20 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

Os gráficos referentes á variação da frequência de oscilação com o tempo para as concentrações de L-metionina de 10, 20, 40, e 60 mg S/L são os gráficos 9, 10, 11, e 12 respectivamente.

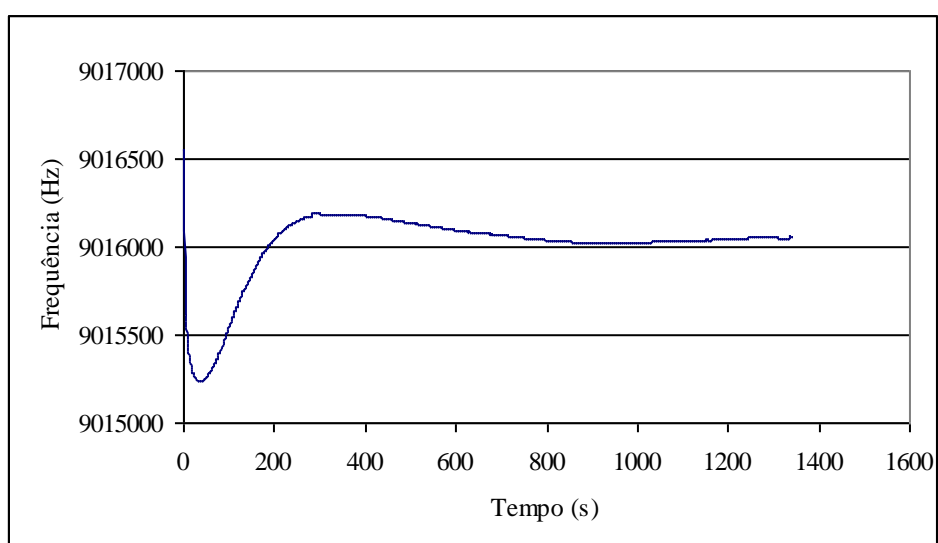


Gráfico 11– Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 40 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

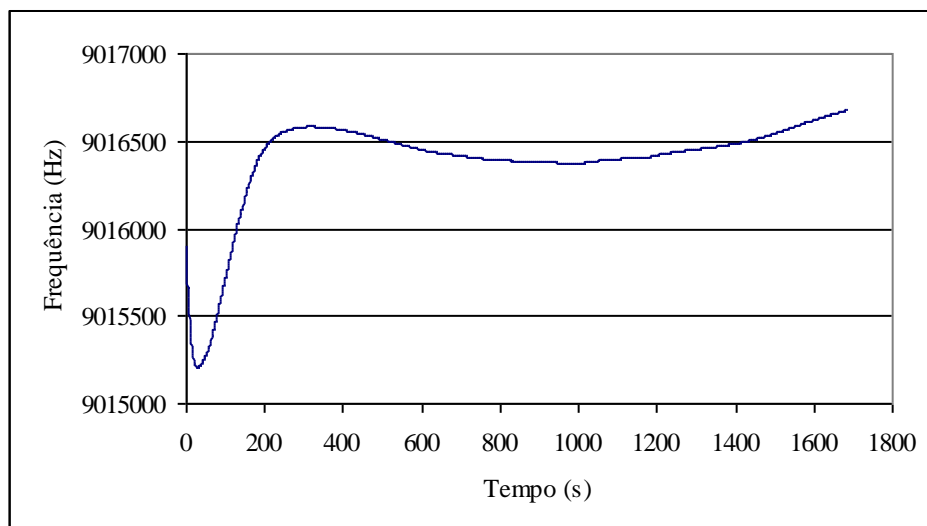


Gráfico 12– Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina a 60 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

Da análise de todos estes gráficos observa-se que após uma diminuição da frequência de cerca de 500 Hz se observa uma subida de cerca de 1500 Hz, atingindo-se, ao fim de 300 s um patamar. Sendo as diferenças de frequência observadas da mesma ordem de grandeza e não correlacionadas com a concentração da solução de L-metionina, conclui-se que, embora o fungo estivesse imobilizado no cristal não parecia haver resposta à L-metionina.

Foram então utilizadas soluções de L-metionina menos concentradas, 0,25 e 0,50mg/L e prolongou-se o tempo de aquisição, encontrando-se os resultados obtidos representados nos gráficos 13 e 14, respectivamente.

Mais uma vez, após um aumento da frequência que é superior para a solução de mais baixa concentração, a frequência tende a estabilizar, pelo que mais uma vez se conclui pela não resposta do fungo

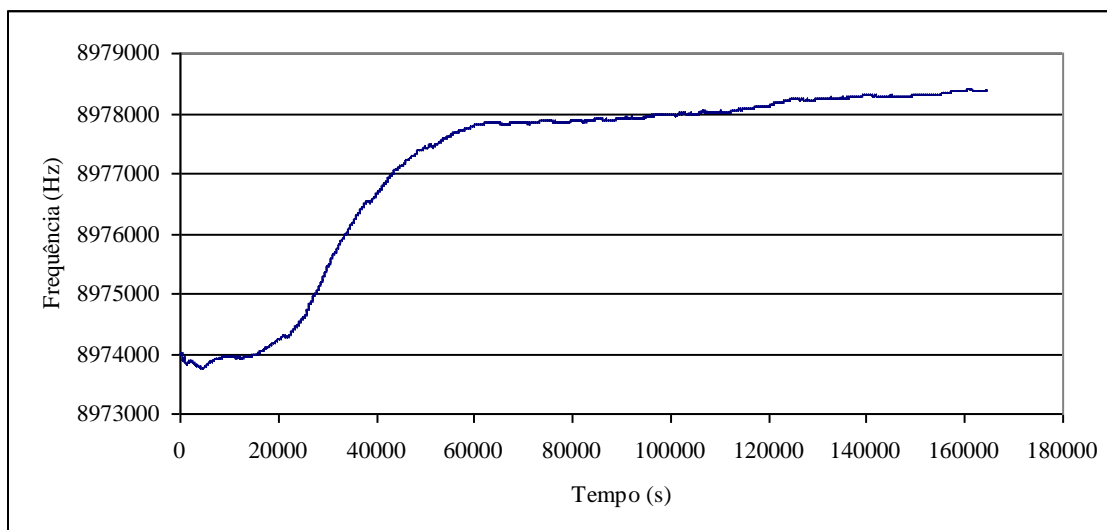


Gráfico 13– Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 0,25 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

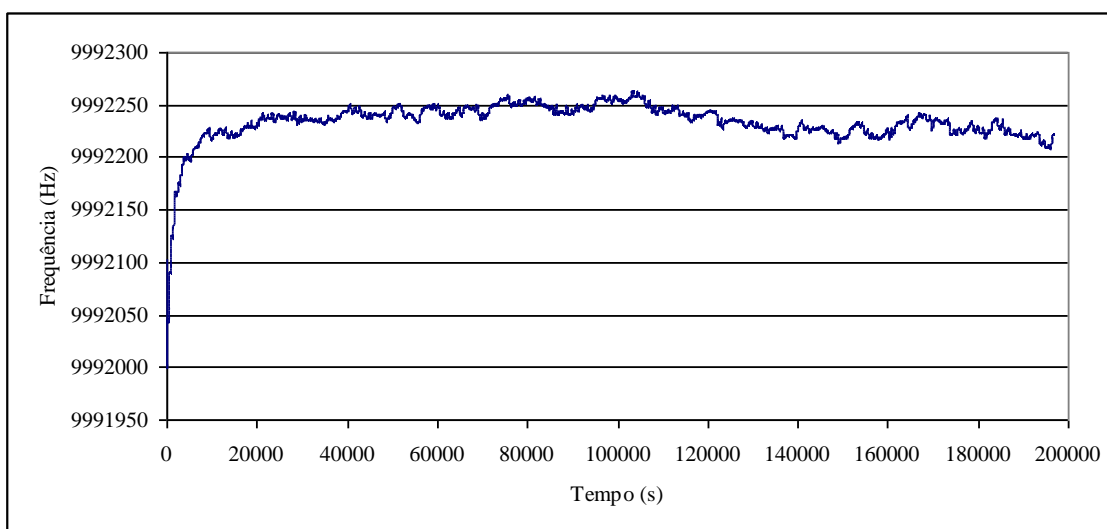


Gráfico 14– Variação da frequência com a imobilização da cultura do fungo directamente sobre o eléctrodo, numa solução L-metionina com 0,5 mg S/L e com a célula na estufa a 28°C

6.4.1 – Método das Adições Separadas

A fim de se estudar a resposta do fungo a várias concentrações de L-metionina começava-se por colocar este composto com uma determinada concentração dentro da célula onde se encontrava o cristal com a imobilização da cultura directa sobre o eléctrodo, colocá-lo no sistema e fazer a aquisição da frequência. Logo que a frequência se notasse estabilizada, tirava-se a célula e com todo o cuidado para não estragar a imobilização que tinha de ser sempre a mesma para cada série, substituíam-se a solução por outra de diferente concentração. Estas operações eram feitas à volta de um bico de bunsen para evitar contaminações.

Os resultados obtidos encontram-se representados nos gráficos da figura 15, onde se pode observar mais uma vez a estabilidade da imobilização e a não resposta do fungo à L-metionina.

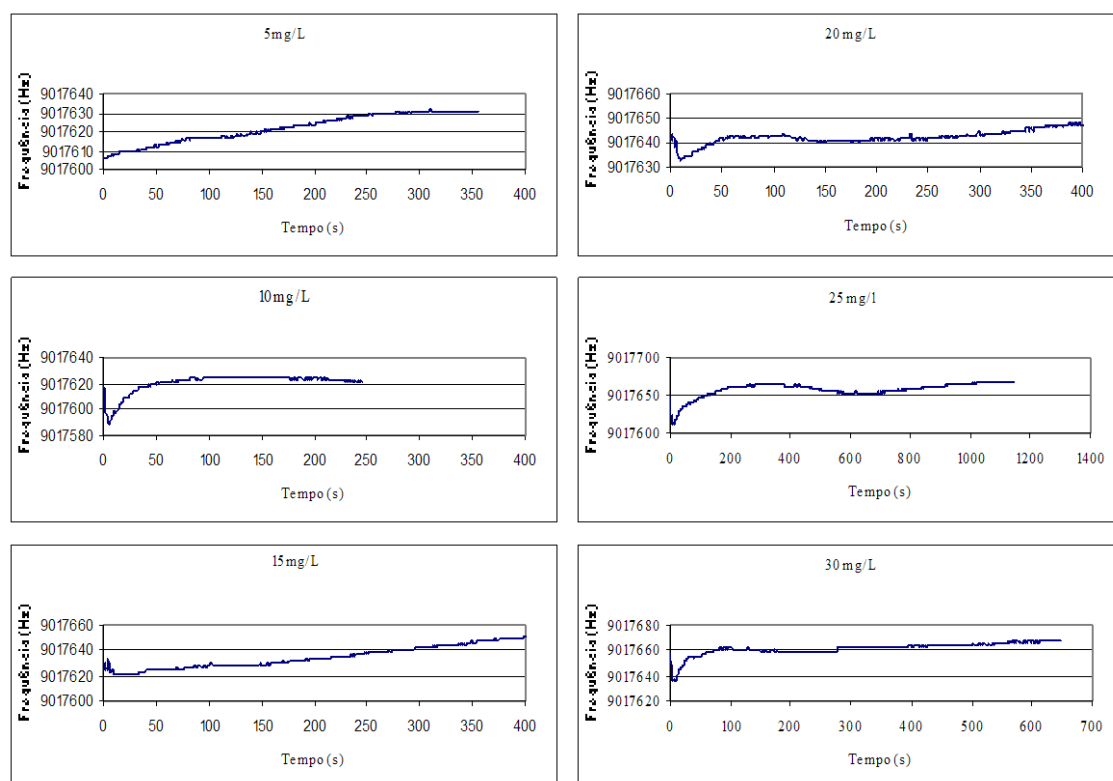


Gráfico 15 – Exemplo dos gráficos obtidos com o método das adições separadas. As concentrações utilizadas foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L de L-metionina.

6.4.2 – Método das Adições Sucessivas

Não se tendo obtido resultados com o método anterior de adição de diferentes concentrações de metionina, provavelmente devido à alteração das condições por excessivo manuseamento do sistema, optou-se por, sem mexer na célula, adicionar sucessivamente através de uma micropipeta, ao líquido já existente quantidades de L-metionina previamente definidas

Com o fungo imobilizado pela cultura directa sobre o eléctrodo, estudou-se o seu comportamento com a L-metionina pelo método das adições sucessivas.

Esta adição era feita rapidamente de modo a não permitir perturbações no sistema.

A maior preocupação com este método era que a solução não estivesse homogeneizada, logo não tivesse as mesmas propriedades em cada ponto. No entanto, foram-se registando resultados dos quais se apresenta uma amostra significativa.

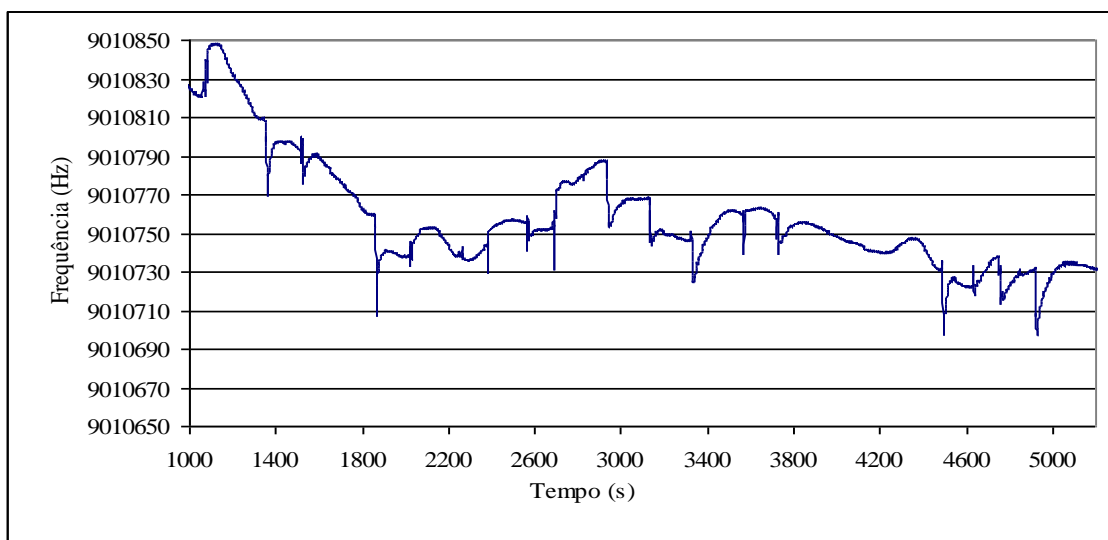


Gráfico 16 – Resultado de adições sucessivas. Em cada adição foram injectadas alíquotas de 0,4 mL de metionina de concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$

Pelo gráfico 16, pode verificar-se que, apesar de uma descida inicial da frequência, não houve uma resposta consistente às várias adições da L-metionina ao longo do ensaio. As injeções notam-se pelas linhas verticais ao traçado do gráfico. Não se conseguiu que a recuperação atingisse a linha de base, ficando abaixo ou acima dela.

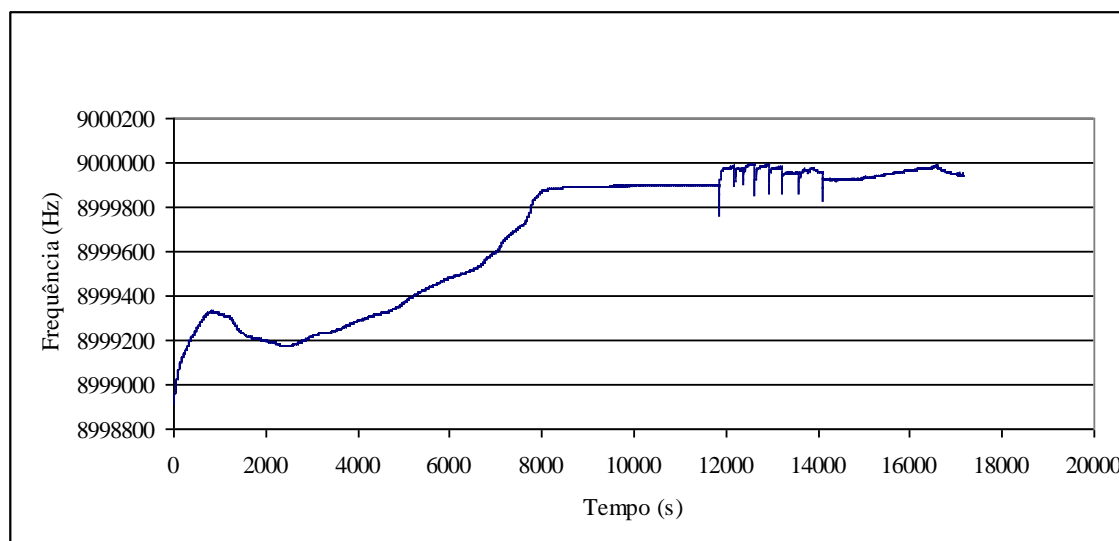


Gráfico 17 – Adições sucessivas de alíquotas de 0,2 mL de metionina com 20µg/mL, depois de ter conseguido estabilizar o sistema

No caso do gráfico 17 conseguiu-se que o sistema estabilizasse e só depois se fizeram adições sucessivas de alíquotas de 0,2 mL de L-metionina com concentração de 20 µg/mL. Este resultado, apesar de parecer mais consistente do que o do gráfico anterior por apresentar uma espécie de patamar, também não mostra a resposta do fungo à adição crescente de L-metionina. Aqui a recuperação foi sempre superior à linha de base

No caso do gráfico 18 foram sendo injectadas concentrações mais elevadas, correspondendo cada uma a uma linha vertical ao traçado do gráfico. As últimas injeções são quase imperceptíveis.

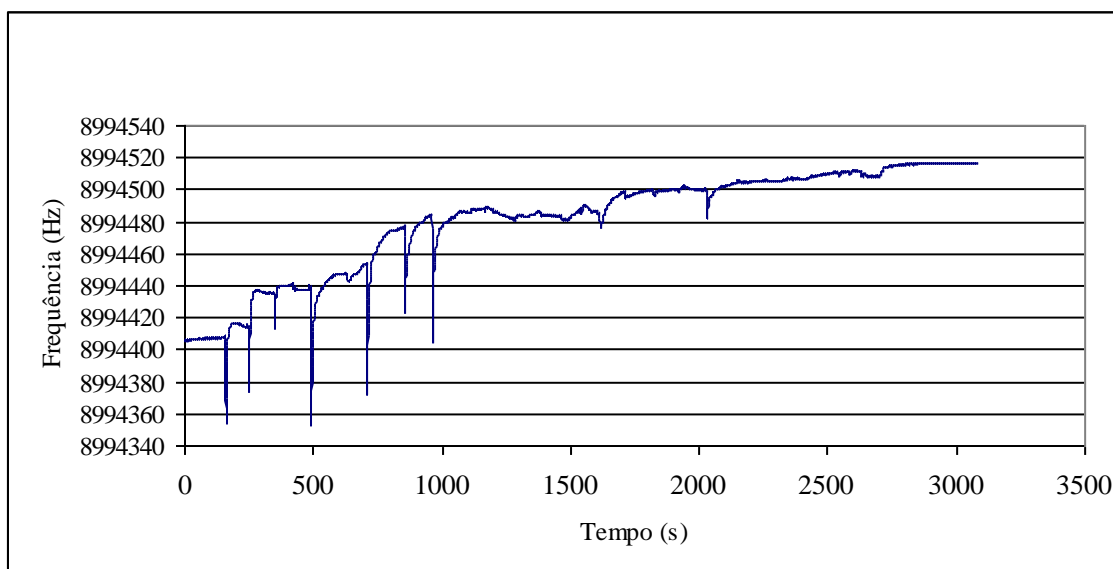


Gráfico 18 – Nesta experiência as adições foram de 4x2 μ L (4x20 μ g/Sml), de 4x10 μ L (4x10 μ gS/ml) e de 3x30 μ L (3x30 μ gS/ml) de L-metionina e de 3x30 μ l de água

No gráfico 18, e apesar de ir sendo adicionada solução de L-metionina, nota-se uma subida da frequência, que não pode resultar do crescimento do fungo. A linha de base nunca foi recuperada.

Nos gráficos 16 17, e 18, não se nota qualquer tipo de concordância. Por essa razão, tentou-se várias vezes utilizar este método que parecia lógico sem, no entanto, ter resultados satisfatórios.

Conclui-se mais uma vez que o fungo não responde á L-metionina.

Tal como os restantes ensaios descritos neste capítulo e tal como os ensaios com as diferentes deposições, também no método das adições sucessivas se verificou uma estabilização não se chegando a qualquer resultado consistente.

6.5 – Determinação da L-metionina Utilizando uma Microbalança de Cristais Piezoelétricos de Quartzo, MCPQ

Como se obtiveram resultados com as culturas líquidas do fungo em L-metionina experimentou-se ensaiar esse método com uma microbalança de cristais piezoelétricos de quartzo. Assim, começou-se por se fazerem ensaios dos meios com e sem fungo.

6.5.1 - -Meio com Fungo e Meio Sem Fungo

Para saber se havia alguma reacção do fungo ao meio onde este se colocava, através da variação da frequência, fizeram-se ensaios com a mesma concentração de L-metionina em células, numa com fungo e noutra sem fungo.

O comportamento do fungo numa cultura líquida de L-metionina com 10,74 mg S/L está representado no gráfico 19 onde é nítida a tendência de descida da frequência ao longo do tempo.

Pode-se explicar este facto por um consumo de L-metionina pelo fungo com o tempo, o que se traduz num aumento da viscosidade e da densidade da solução devido aos produtos do metabolismo da metionina pelo fungo, ou até do crescimento deste fungo, assunto que só poderá ser estudado mais tarde.

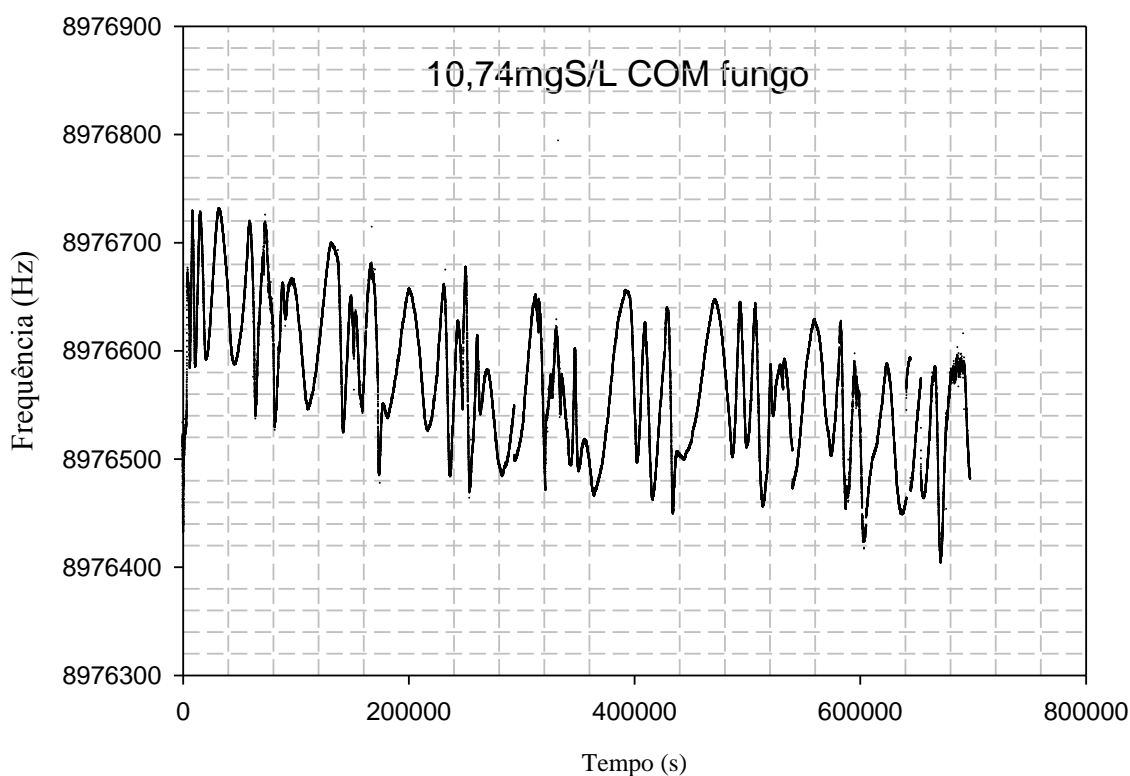


Gráfico 19 – Variação da frequência com o tempo, de uma cultura líquida de 10,24 mg S/L em que há fungo no líquido.

Por seu lado, para a obtenção do gráfico 20 foi utilizada uma solução de L-metionina igual à anterior, de concentração 10,74 mg S/L, mas na qual não se colocou fungo.

Nas soluções em que havia fungo, a frequência apresentava uma tendência para diminuir

Contrariamente ao gráfico anterior não se observa qualquer tendência de descida. Para confirmação foram realizadas mais experiências nas mesmas condições, isto é, com e sem fungo e o comportamento observado foi sempre o mesmo

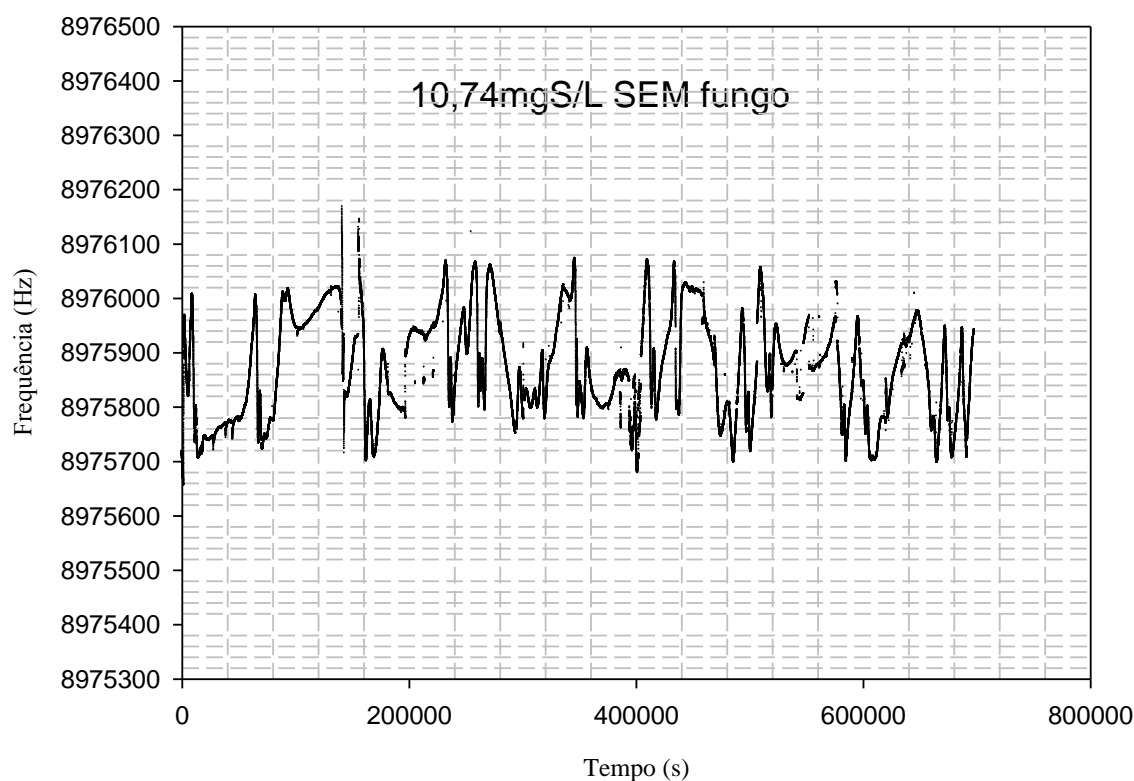


Gráfico 20 – Variação da frequência com o tempo numa solução de 10,24 mg S/L de L-metionina e sem fungo.

Destes gráficos pode concluir-se que o fungo sofre variações ao longo do tempo com o consumo da L-metionina, alterando a solução onde se encontra, conduzindo a um decréscimo de frequência.

6.5.2 - Variação da Frequência com a Concentração de L-metionina

Uma vez que estes gráficos ou estes resultados fizeram sentido, continuou-se a trabalhar com a solução líquida em que apenas se fazia variar a concentração de L-metionina. É necessário referir que a quantidade de fungo em cada cultura não era sempre a mesma, uma vez que, não se conseguia cortar, da cultura sólida, pedaços sempre iguais. As concentrações de L-metionina, equivalente em enxofre, variaram entre os 0,50 e os 6,0 mg S/L.

É de referir que para todas as concentrações de L-metionina, a solução que inicialmente era transparente, ao fim de um intervalo de tempo dependente da concentração, ficava turva, o que indica o metabolismo do fungo

Podem exemplificar-se alguns resultados com os gráficos que se obtiveram. Estes gráficos são todos resultantes do consumo de L-metionina pelo fungo em cultura líquida.

O gráfico 21 mostra a variação da frequência com o tempo, numa cultura líquida, em que a concentração de L-metionina, equivalente em enxofre, é de 0,50 mg S/L. Aqui, vai tentar relacionar-se a concentração do meio com a variação de frequência e o tempo que o fungo demora para estabelecer um patamar, isto é, até atingir uma frequência constante, estabilizada.

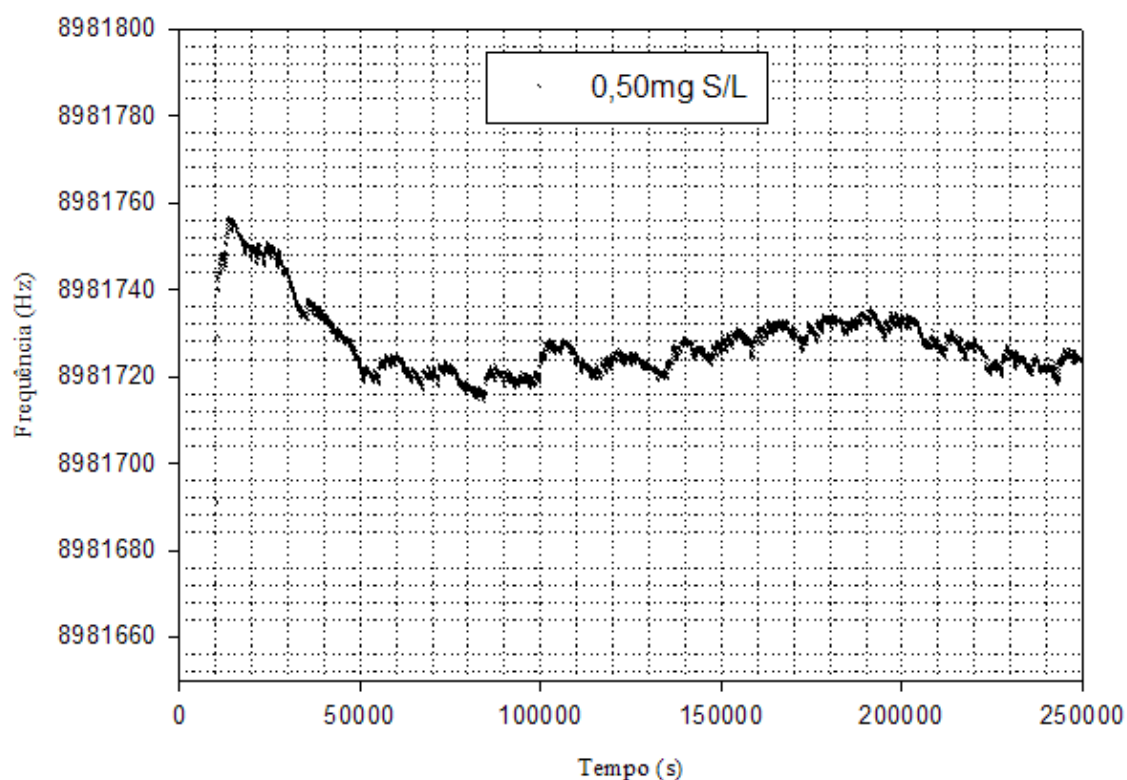


Gráfico 21 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 0,50mg S/L.

Como se trata de uma concentração baixa de L-metionina, o gráfico mostra uma descida seguida de um patamar logo nos primeiros 50000 segundos. Aqui, admite-se que o fungo consumiu L-metionina até ele próprio estabilizar para depois continuar com o seu metabolismo que ainda não se conhece.

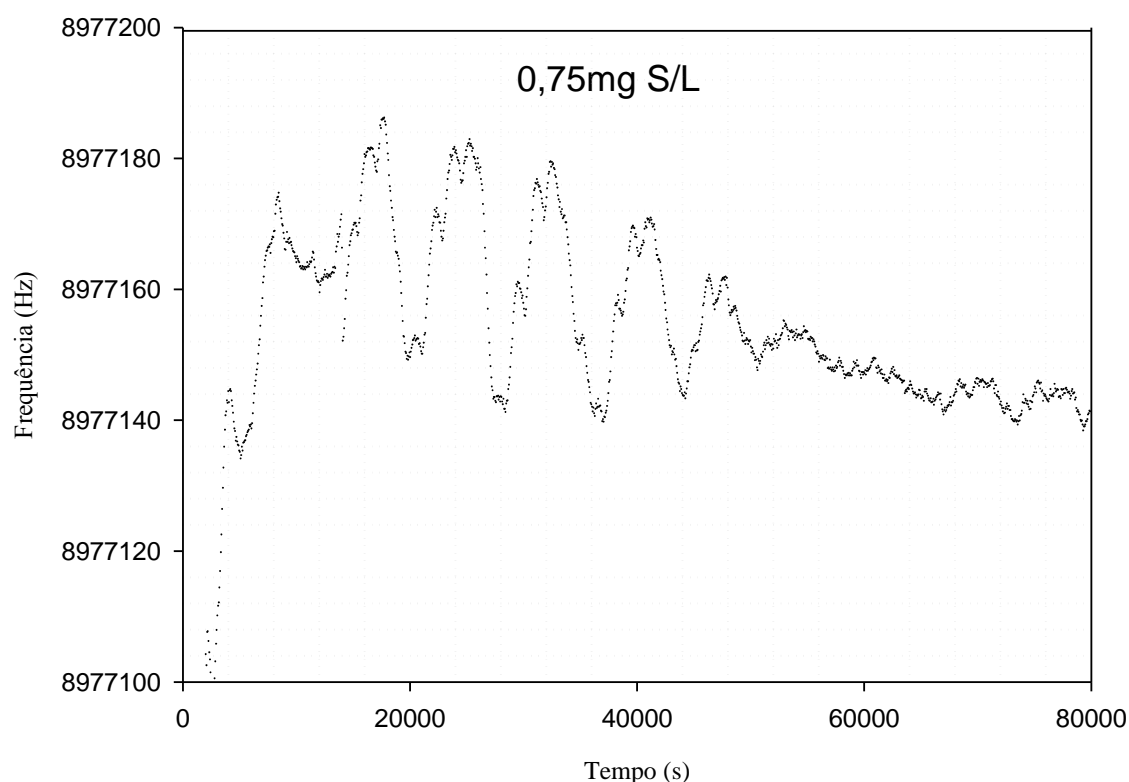


Gráfico 22 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 0,75 mg S/L.

No gráfico 22, como a concentração de L-metionina é superior à concentração do gráfico 21, 0,75 e 0,50 mg S/L, respectivamente, nota-se uma descida maior e vê-se que o tempo necessário para que o fungo atingisse um patamar, é também maior, neste caso de 68000 s. Começa a verificar-se que como neste caso o fungo dispõe de mais metionina demora mais tempo a consumi-la ou a metabolizá-la.

No gráfico 23, a variação entre a frequência e o tempo, resultante da uma cultura líquida de concentração 1,00 mg S/L, nota-se que há uma descida ainda maior e que o patamar demora mais tempo a ser atingido do que nos gráficos anteriores.

Através do gráfico 24, em que a concentração de L-metionina é de 1,50 mg S/L vê-se que com o aumento da concentração do aminoácido aumenta também o declive do gráfico e aumenta ainda o tempo em que o fungo demora a estabelecer um patamar. Este patamar é atingido aos 210000 segundos.

Por estes exemplos apresentados até aqui, conclui-se que o tempo que o fungo demora a atingir um patamar é depende da concentração de L-metionina. Maior a concentração de L-metionina, maior o tempo que a frequência demora a estabilizar.

Pode-se admitir que isto é devido ao tempo que o fungo demora a metabolizar a L-metionina de que dispõe.

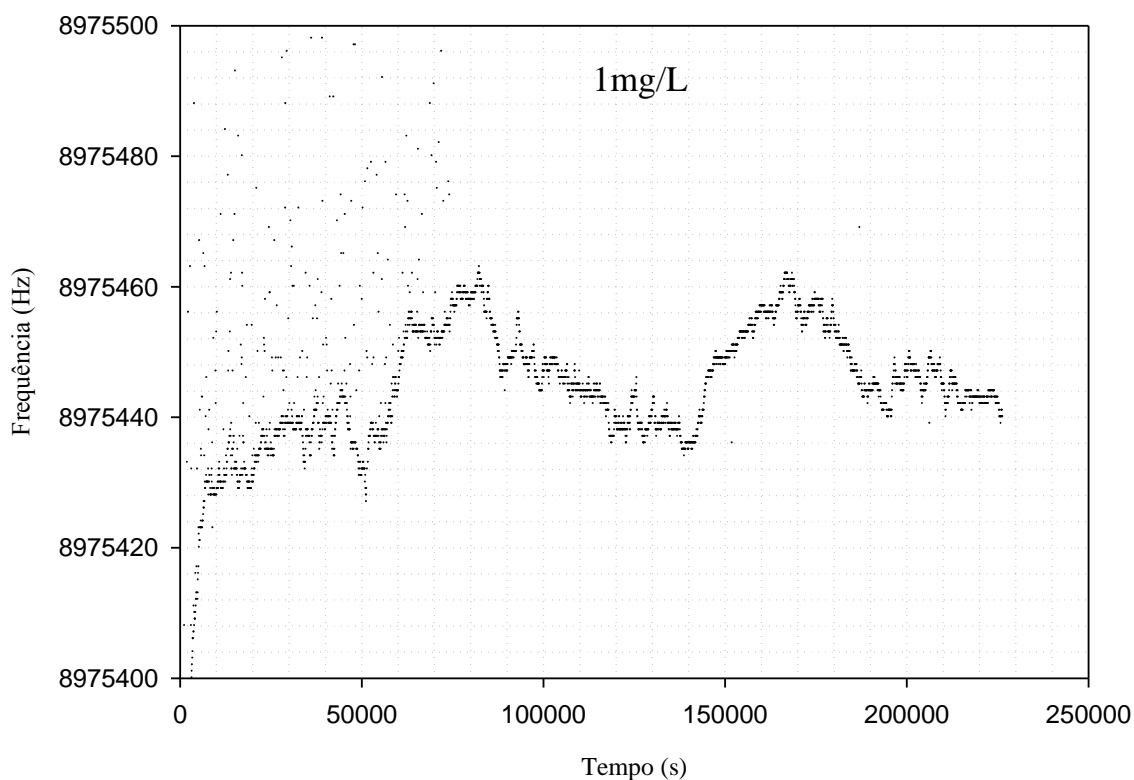


Gráfico 23 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 1 mg S/L

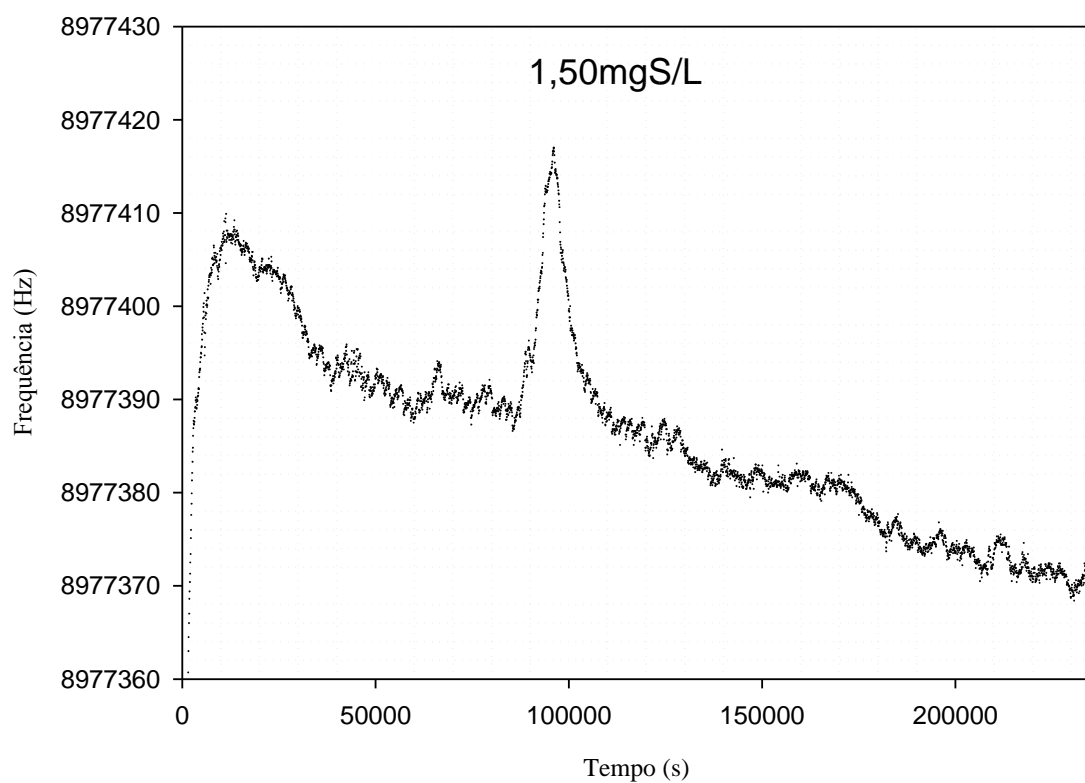


Gráfico 24 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 1,50 mg S/L

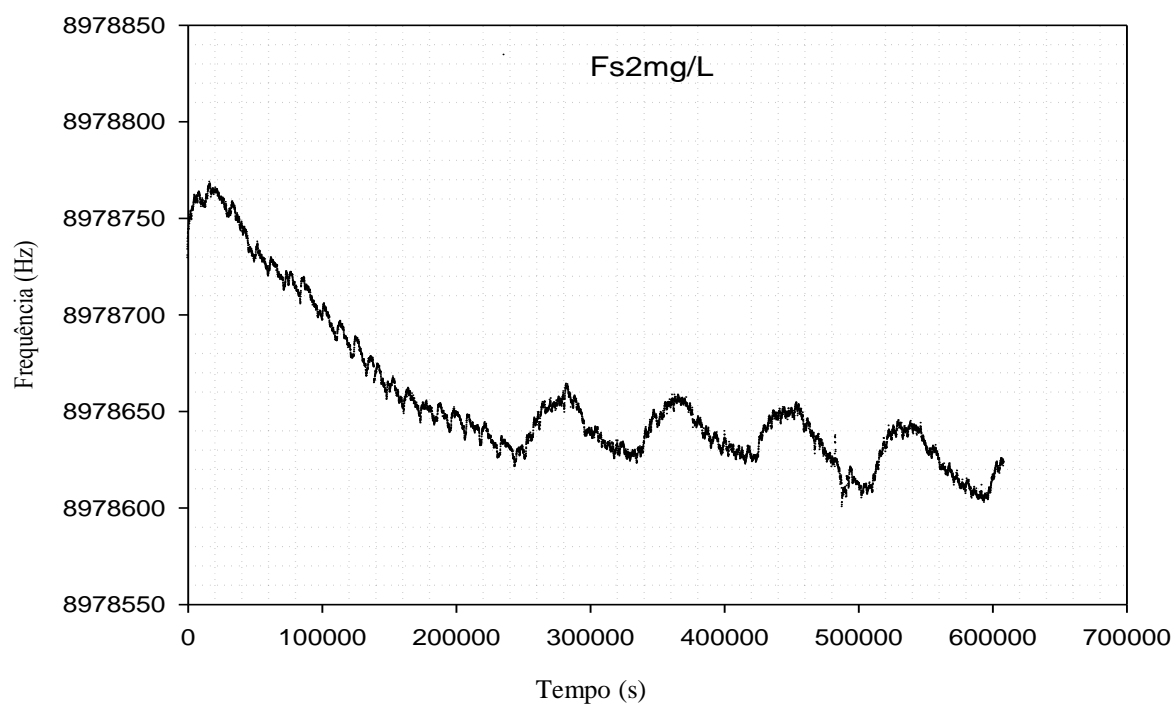


Gráfico 25 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 2,00 mg S/L

Pelo gráfico 25, observa-se que a concentração de L-metionina de que o fungo dispõe é maior, 2 mg S/L, logo maior é o tempo que demora a consumi-la ou a metabolizá-la, pelo que o patamar é atingido aos 240000 segundos. Este tempo é maior do que o necessário para atingir um patamar com 1,50 mg S/L, pois também a concentração em enxofre é maior.

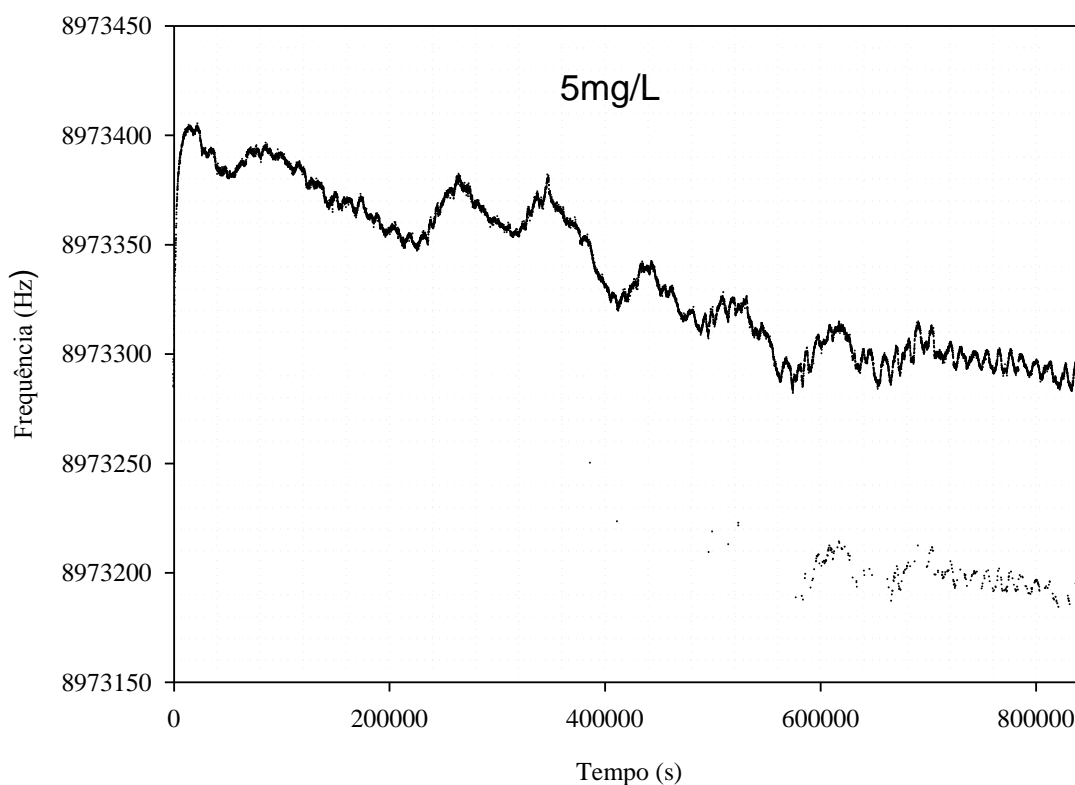


Gráfico 26 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 5,00 mg S/L

Através deste gráfico, 26, em que a concentração de L-metionina do meio é muito maior, 5 mg S/L, do que a do meio referente ao gráfico anterior, 2 mg S/L, pode verificar-se que também foi muito maior o tempo que o fungo demorou a consumi-la. O tempo que a frequência demorou a descer até atingir um patamar é superior a qualquer um dos outros, 640000s, em virtude de se tratar também de uma concentração muito superior a qualquer uma das anteriores.

Do mesmo modo se passa com o gráfico 27. Este resulta de uma cultura em que a concentração de L-metionina é de 6 mg S/L. Aqui, o tempo em que o fungo atinge o patamar é maior do que em qualquer outro gráfico referente a uma cultura de menor concentração e atinge os 800000 segundos.

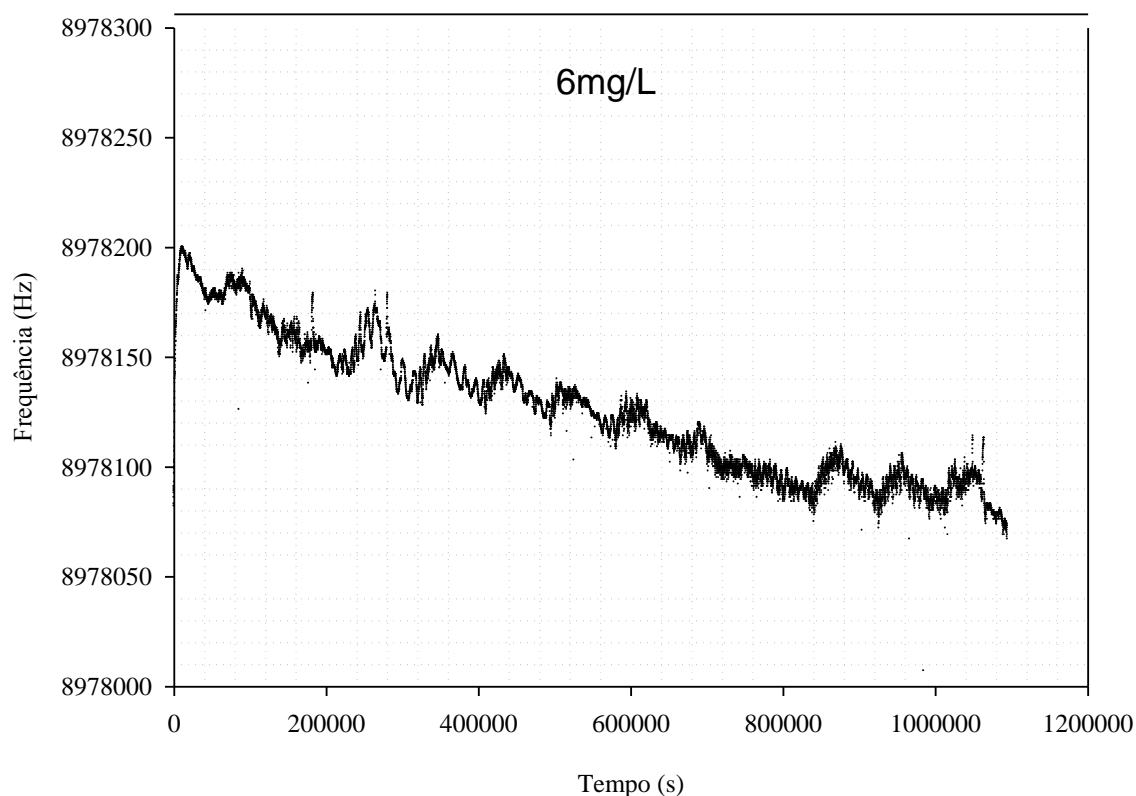


Gráfico 27 – Variação da frequência com o tempo numa cultura líquida em que a concentração de L-metionina é de 6,00 mg S/L

No gráfico 28 encontra-se representado o tempo em que a frequência demora até atingir um patamar, nos diferentes ensaios feitos, em função da concentração de L-metionina presente na solução.

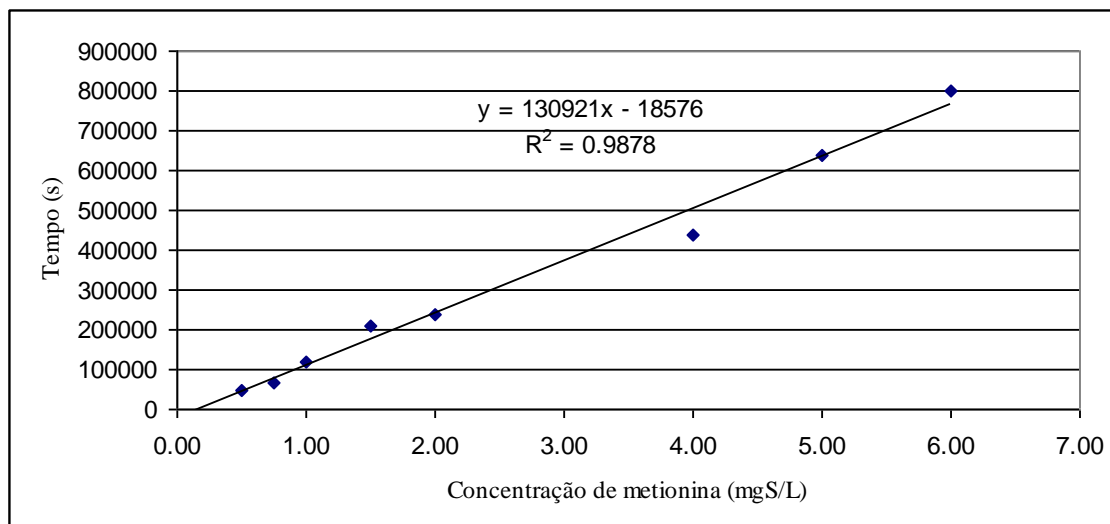


Gráfico 28 – Recta de calibração resultante dos tempos em que o fungo demorou a atingir um patamar com cada uma das concentrações de L-metionina do meio em que se encontrava

Observa-se claramente uma proporcionalidade directa, e em que o facto de alguns pontos se afastarem da recta de regressão poderá ser devido às diferenças das quantidades de fungo utilizadas nas diferentes experiências.

Com o método da cultura líquida, conseguiu-se uma curva de calibração. Isto prova que este sensor mede o enxofre orgânico existente na metionina.

Com base nas experiências descritas neste capítulo pode concluir-se que o cristal piezoeléctrico de quartzo, em conjunto com o fungo *Sporothrix*, pode fornecer um sensor útil para a medição do enxofre orgânico em amostras ambientais.

6.6 – Resposta do Cristal Piezoeléctrico à Adição de L-metionina

Como se viu no ponto 6.5.2, o sensor, formado pela Microbalança de Cristais Piezoeléctricos de Quartzo e pela solução com o fungo, responde à variação da concentração de L-metionina. Para testar este sensor trabalhou-se ainda com a MCPQ com

o fungo em água e com a MCPQ e água sem fungo, a cujas soluções eram adicionados 60 μL de metionina com 5 μg S/ μL

6.6.1 – Resposta do Cristal Piezoelétrico numa Solução com Fungo, à Adição de L-metionina

Numa montagem como a que está representada na figura 17, colocou-se um copo onde estava instalada uma MCPQ com uma solução de água e de fungo. O fungo era cortado da respectiva cultura. Tentavam-se cortar sempre porções de fungo do mesmo tamanho, mas nunca se conseguia que estes pedaços fossem iguais.

Quando a frequência estabilizava, iam-se adicionando os microlitros de L-metionina. Esperava-se até que o fungo recuperasse de novo a frequência, em virtude de ter consumido a L-metionina que teria sido responsável pelo abaixamento desta, uma vez que teria feito variar as propriedades da solução.

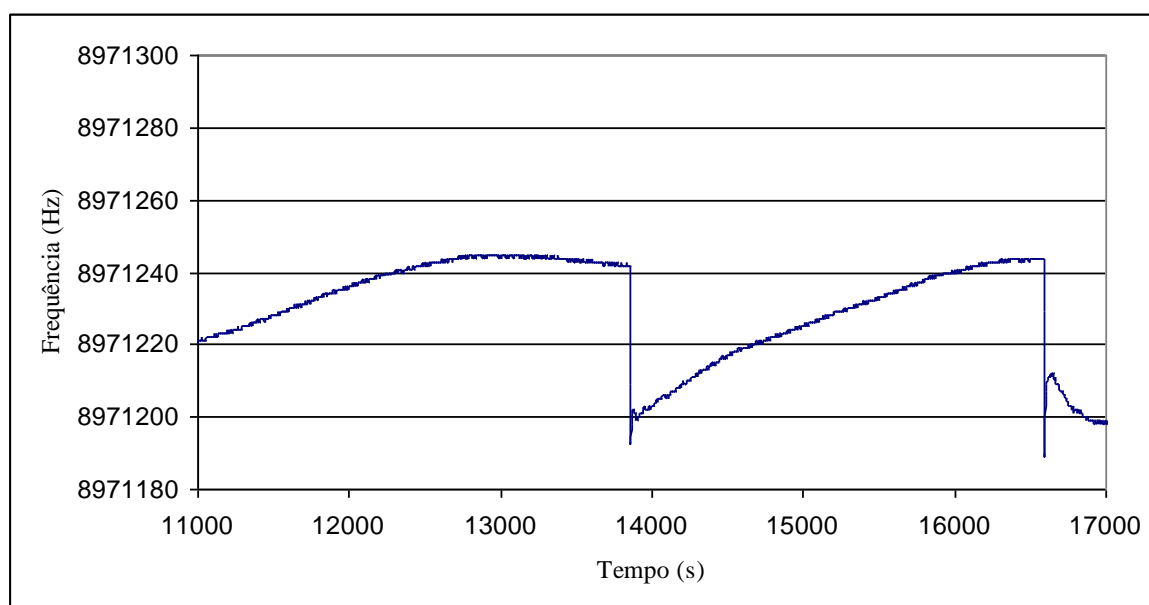


Gráfico 29 – Adição de 2x60 μL ou de 2x300 μg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.

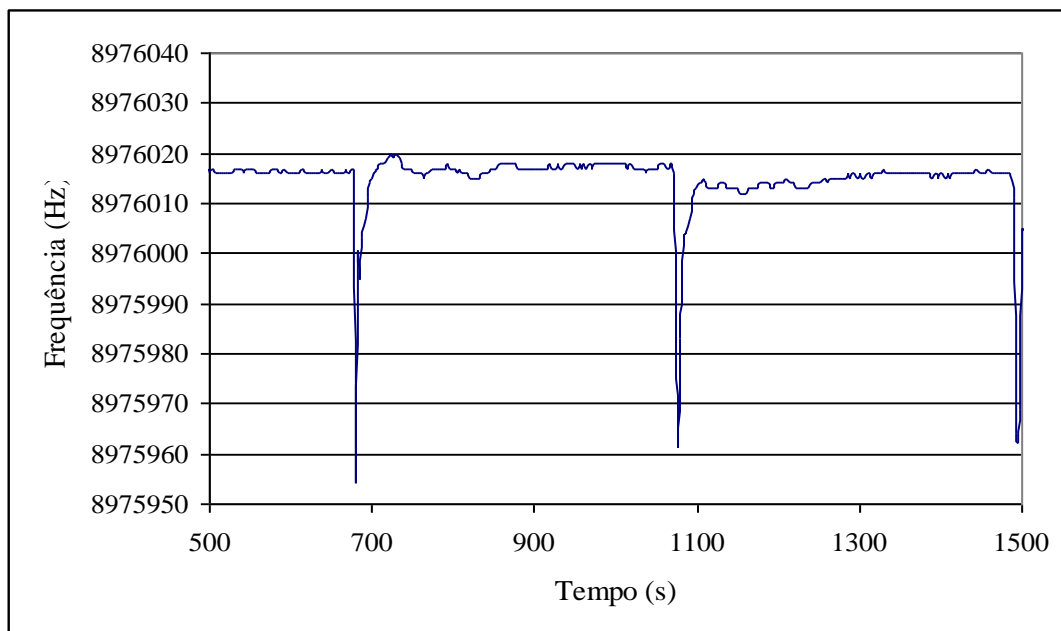


Gráfico 30 – Adição de 3x60µL ou de 3x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.

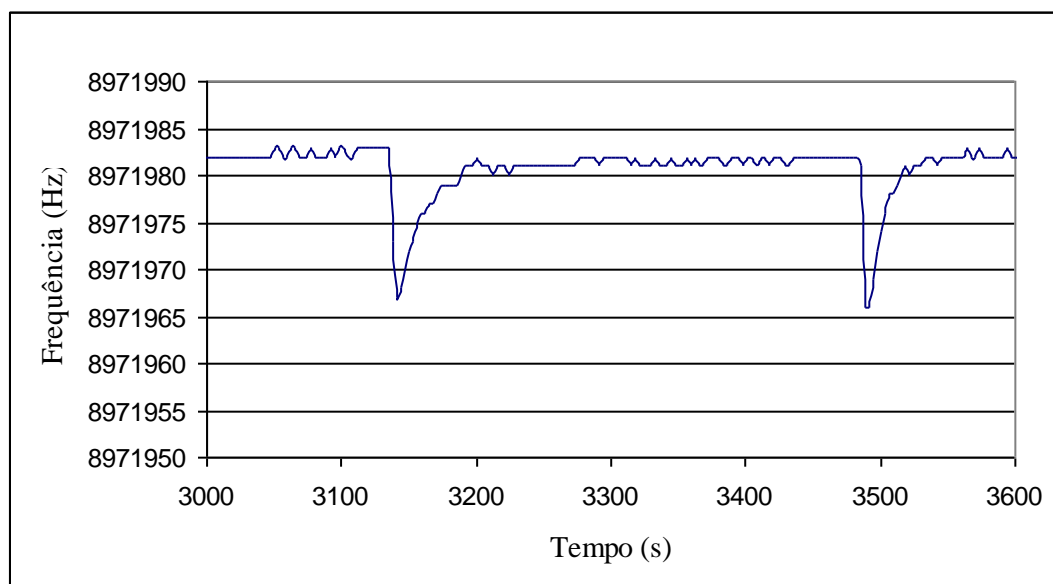


Gráfico 31 – Adição de 2x60µL ou de 2x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ, água e fungo.

Pelos gráficos 29, 30 e 31 pode ver-se que a L-metionina injectada foi consumida pelo fungo. A solução onde se encontrava o fungo recuperou as propriedades originais, uma vez que a frequência foi retomada.

A solução, depois da experiência, tornou-se translúcida, o que parece ser devido aos produtos da metabolização da metionina pelo fungo, como se pode ver na figura 27.



Figura 27 – Exemplo da solução depois de o fungo ter metabolizado toda a L-metionina existente.

Os valores tirados dos gráficos 29, 30 e 31 poderão não ser comparáveis devido às respostas às variações de L-metionina serem dependentes do tamanho do fungo, da sua idade e de o cristal não ser sempre o mesmo.

6.6.2 – Resposta do Cristal Piezoeléctrico à Adição de L-metionina, numa Solução Sem Fungo

Com a montagem referida anteriormente e mostrada na figura 17, trabalhou-se com a MCPQ e água sem fungo, a que eram adicionados alguns microlitros de L-metionina com a mesma concentração da experiência anterior, $5\mu\text{g S}/\mu\text{L}$.

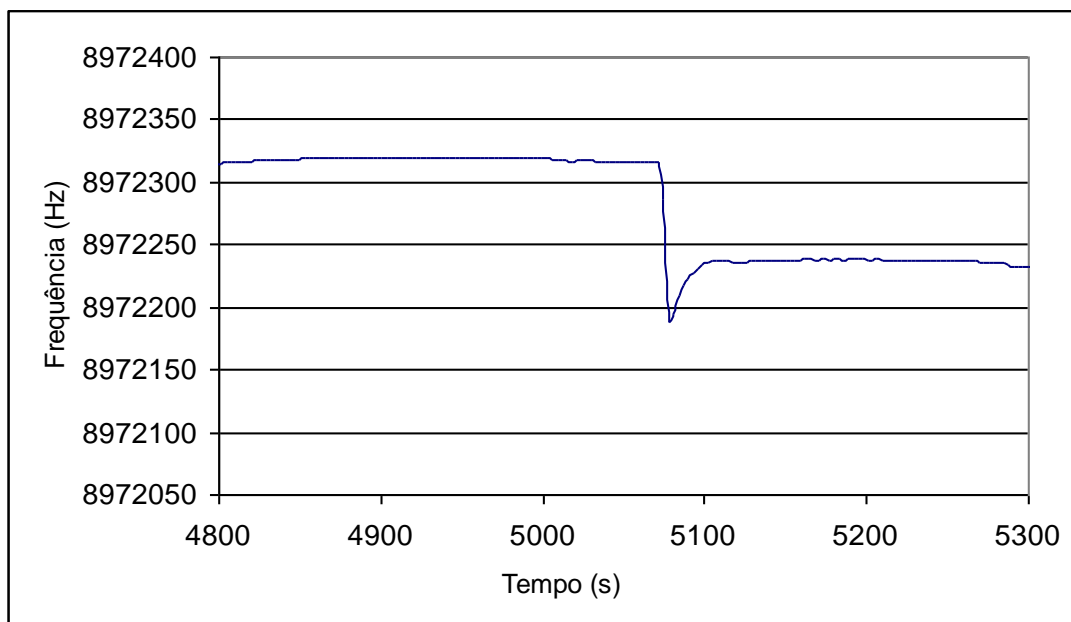


Gráfico 32 – Adição de 1x60µL ou de 1x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.

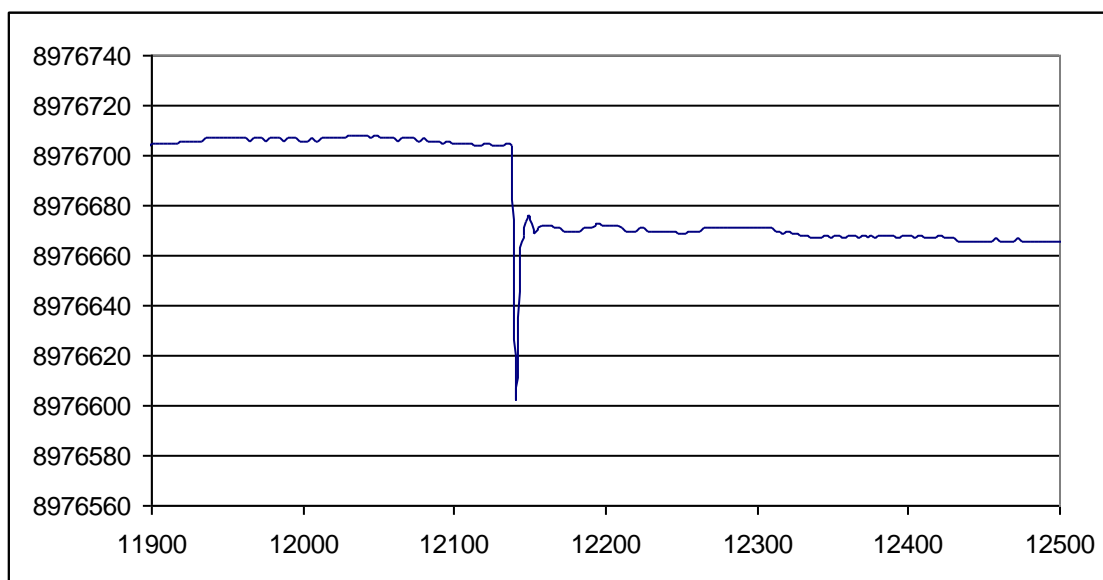


Gráfico 33 – Adição de 1x60µL ou de 1x300µg S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.

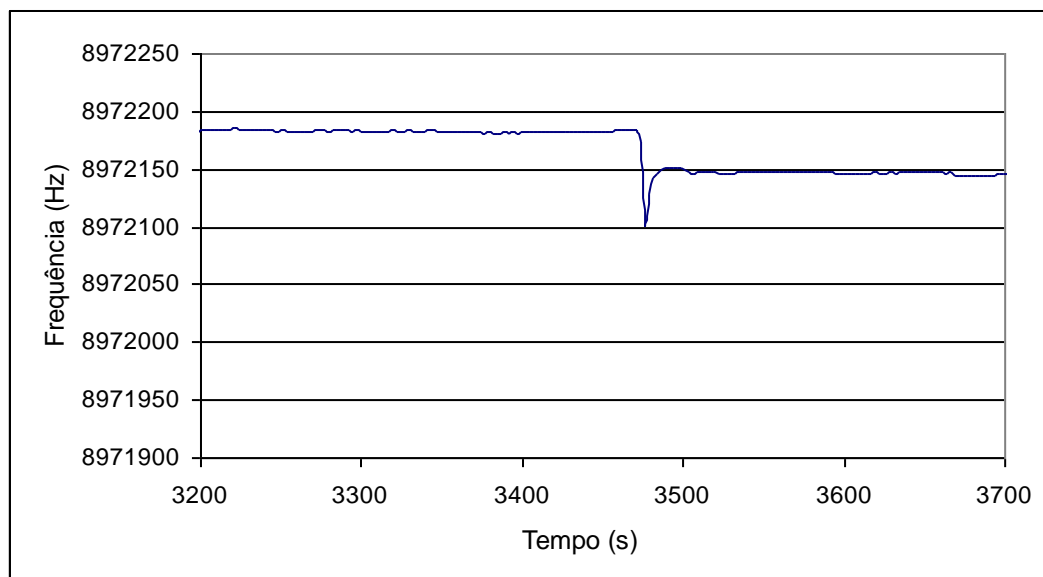


Gráfico 34 – Adição de 1x60 μ L ou de 1x300 μ g S de L-metionina ao sistema MCPQ e água sem fungo.

Pelos gráficos 32, 33 e 34, pode ver-se que quando só existe o cristal em água e se adiciona L-metionina, esta altera as propriedades da água de modo que a frequência nunca retoma a linha de base.

Neste caso, a L-metionina não pôde ser metabolizada ou consumida pelo fungo pois ele não estava presente na solução e daí não resultar na recuperação da linha de base.

Todavia, observou-se um abaixamento da frequência causada pelas modificações nas propriedades da solução que provocaram um aumento da massa desta, logo um abaixamento da frequência exibida pelo cristal, lida pelo frequencímetro e registada pelo computador.

Na tabela 1, estão resumidos as respostas do cristal piezoelétrico à adição de L-metionina, com e sem fungo, no que respeita ao abaixamento da frequência imediatamente após a adição, DF, à diferença de frequências antes e depois da adição de L-metionina, resposta, e o tempo que o cristal demora a estabilizar na nova frequência, tempo de recuperação, para os diferentes cristais.

Tabela 1 – Comparação das respostas do cristal piezoelétrico à adição de L-metionina, com fungo e sem fungo

Fungo			Água		
DF (Hz)	Tempo Rec (s)	Cristal	DF (Hz)	Resposta (Hz)	Cristal
37	264	1	35	18	1
37	123	4	43	14	5
43	492	1	55	11	4
44	186	4	61	18	5
45	138	4	62	38	5
46	99	4	69	21	4
47	46	4	70	5	5
49	2262	3	74	11	5
54	714	1	75	29	4
54	3111	3	76	30	5
54	36	5	78	34	5
59	1677	1	81	17	4
63	30	5	82	38	4
99	800	4	86	40	4
			90	15	4
			97	50	5
			100	52	4
			101	36	5
			103	57	4
			104	74	5

DF – Diferença de Frequência, em Hz, antes e depois da injeção.

Resposta – Diferença do valor mais baixo para o valor mais elevado da frequência, em Hz.

Tempo Rec – Tempo, em s, que o cristal demora a atingir a frequência inicial

Cristal – Número do cristal utilizado

Como já foi referido atrás, os valores desta tabela variam muito e não poderão ser comparáveis devido a que a sua obtenção foi feita com diferentes cristais. Além disso, as respostas às variações de L-metionina são sempre dependentes do tamanho, da idade e do estado do fungo com que se trabalha.

Estas últimas experiências são mais uma evidência de que o sistema MCPQ e o fungo *Sporothrix* formam um sensor para a determinação do enxofre orgânico, uma vez que são sensíveis à adição de L-metionina na solução onde se encontram.

7 – CONCLUSÃO GERAL

Como já foi referido no resumo, a diversidade de águas sulfúreas no Nordeste Transmontano e a necessidade de fazer a especiação do enxofre, fez com que se empreendesse na construção de um sensor que permitisse quantificar o enxofre orgânico existente nessas águas e em outras amostras ambientais.

Houve, assim, necessidade de construir um sensor que permitisse quantificar o enxofre orgânico nas amostras ambientais. Isto, porque uma vez que já havia à disposição alguns métodos padrão que permitem determinar o enxofre inorgânico, só era necessário introduzir um método, simples, para o enxofre orgânico.

A necessidade de construir um sensor que permitisse quantificar o enxofre orgânico nas várias amostras de águas sulfúreas de que se dispõem, levaram a que se trabalhasse com o fungo *Sporothrix*, que segundo Lepidi, Nuti e Filippi tinha um bom crescimento nos meios com espécies de enxofre. Os autores referiram que a melhor resposta era a compostos do tipo R-C-S-C-R, entre eles a L-metionina.

Assim, confirmou-se a existência deste fungo nas águas das fontes sulfúreas. Nestas, foram encontradas além do fungo *Sporothrix* outras espécies de microorganismos tais como leveduras, bactérias e penicilina.

No laboratório, fez-se a cultura dos limos de uma fonte de água sulfúrea onde se isolaram as várias espécies dos microorganismos neles existentes. Começou então a trabalhar-se com o fungo *Sporothrix* cuja cultura se fazia apenas no meio PDA da MercK.

Com este microorganismo, o fungo *Sporothrix*, tentaram-se várias imobilizações sobre o cristal piezoelétrico de quartzo, a fim de ser construído o sensor para a referida determinação do enxofre orgânico. Com cada um destes sensores foram experimentadas diversas metodologias utilizando a L-metionina como fonte de enxofre orgânico.

As primeiras metodologias usadas foram conduzidas com a imobilização do fungo sobre o cristal, usando alginato de sódio. Nenhuma destas formas de imobilização com alginato, contas, e polimerizações sobre o cristal, conduziram a resultados consistentes.

Entretanto, determinou-se o comportamento do fungo em meio líquido, com várias concentrações de L-metionina. Conclui-se que ao fim de algum tempo o fungo consumia toda a L-metionina que lhe era fornecida.

Por via disto, passou a tentar medir-se o enxofre orgânico, o existente na L-metionina, com a MCPQ e o fungo, desta vez não imobilizado, mas em cultura líquida à qual era adicionada uma determinada quantidade, pré-definida, de L-metionina. Por esta via conseguiu-se estabelecer uma curva padrão que está conforme a quantidade de L-metionina, ou enxofre orgânico que eram injectados ou adicionados à solução do sensor, MCPQ com fungo em meio líquido.

Tendo assim constatado que, embora com limitações, o sensor proposto funcionava para a determinação do enxofre orgânico.

Com a finalidade de testar este sensor fizeram-se ainda uma série de experiências que consistiam em utilizar a MCPQ só com água e a MCPQ com água e fungo. A ambas as soluções eram adicionadas iguais quantidades de L-metionina.

Aconteceu que no sistema formado pela MCPQ com água e sem fungo, ao ser adicionada a quantidade de L-metionina previamente estipulada, a frequência descia, mas não retomava o valor inicial. Pode-se tentar explicar este facto porque ao ser adicionada a L-metionina, as propriedades da solução, tais como a densidade e a viscosidade foram alteradas, o que provocou uma diminuição da frequência da solução.

No entanto, no sistema MCPQ com água e fungo, depois de lhe ser adicionada a L-metionina, a frequência, depois de descer, retoma o valor original. Isto pode ser explicado pelo facto de o fungo ter metabolizado toda a L-metionina que lhe era fornecida, uma vez que é sensível a esta, logo ao enxofre orgânico.

Provou-se assim, que o sensor, já antes definido para a determinação do enxofre orgânico estava a funcionar.